

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

APPLICATION DES PARAMÈTRES PHOTOSYNTHÉTIQUES DANS L'ÉVALUATION  
DE LA TOXICITÉ DES MÉTAUX

MÉMOIRE

Présenté comme exigence partielle à la Maîtrise en sciences de l'environnement

PAR  
Cyril SAISON

DÉCEMBRE 2009

# UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

Service des bibliothèques

## Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 -Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article **11** du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

*« Vagabonder à la surface des océans est souvent source de sérénité et, parfois, permet de tutoyer ses rêves. S'y immerger, c'est s'ouvrir à son observation et à sa compréhension. »*

- Nicolas Hulot

## REMERCIEMENTS

J'ai pu effectuer une maîtrise en science de l'environnement grâce au soutien de nombreuses personnes que je désire remercier par ces quelques lignes.

Dans un premier temps, je remercie au plus haut point mon directeur de maîtrise, le Pr. Radovan Popovic pour sa bonne humeur, son soutien et son amitié. Son dévouement à son travail, la transmission de sa passion pour la recherche scientifique et la patience dont il a fait preuve lors de la construction des articles.

Merci à mes parents, et à toute ma famille, de m'avoir appuyé tout au long de mes études et de m'avoir transmis ces valeurs qui font ce que je suis aujourd'hui.

Je remercie aussi le Pr. Philippe Juneau pour son aide, ses conseils et pour nous avoir donné l'accès à son laboratoire. Je remercie aussi les Professeurs Mario Morin et Jérôme Claverie pour m'avoir permis cette fabuleuse aventure dans le monde des nanoparticules.

Je remercie particulièrement tous mes collègues de laboratoire pour tous les moments passés à vos côtés autant professionnels qu'amicaux. Merci à François Perreault pour m'avoir communiqué ses connaissances, pour nos joutes orales, nos aventures halieutiques et tout simplement être devenu un ami indispensable. Je tiens à remercier Laura Pirastru, Nadia Ait Ali, Luc Morin, Olivier Didur, Nicolas Besnier, Louka Sirois, Catherine Tardy et Julien Gogot.

Je remercie les collègues de l'UQAM, Annie Chalifour, Jean-Christophe Daigle, Laurence Piché, Wei Heng Zhong, Charle Deblois, Liane Durand, Marie-Claude Perron et Gabrielle Vernouillet.

Je remercie les Pr. Fabrice Franck (Université de Liège, Belgique), Claude Fortin (INRS-ETE), Mohamed Darwish (National Research Center, Egypte), Szilvia Bajkan et Laszlo Kovacs (BRC, Université de Szeged, Hongrie).

Je remercie tous les gens de l'Institut des Sciences de l'Environnement (ISE) et du département de Chimie de l'UQAM.

Je remercie ces amis qui font que la vie est bien plus plaisante : Etienne, Chloé, Marjo, Laurent, Emilie, Bat.

Je remercie aussi la personne qui compte le plus pour moi, celle qui m'a permis de traverser les périodes les plus sombres et de partager tous ces moments de bonheur. Merci mon ange de m'avoir supporté, soutenu, encouragé et aimé.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b>	<b>1</b>
 <b>CHAPITRE I LA PHOTOSYNTHÈSE</b>	 <b>4</b>
1. INTRODUCTION	4
2. LE PHOTOSYSTÈME II	7
2.1. <i>Le complexe antennaire du photosystème II</i>	7
2.2. <i>Le centre réactionnel du photosystème II</i>	7
2.3. <i>Le complexe de dégagement d'oxygène</i>	8
2.4. <i>Absorption de l'énergie lumineuse</i>	9
2.5. <i>Séparation de charge dans la réaction photochimique primaire du PSII</i>	12
2.6. <i>Le transport transmembranaire des électrons</i>	14
2.7. <i>La photophosphorylation</i>	16
2.8. <i>Dissipation d'énergie sous forme de chaleur</i>	17
2.9. <i>Dissipation d'énergie sous forme de fluorescence</i>	18
2.10. <i>La fluorescence chlorophyllienne : La cinétique rapide</i>	19
2.11. <i>La fluorescence chlorophyllienne modulée</i>	22
3. LE PHOTOSYSTÈME I	25
3.1. <i>Les antennes collectrices de lumière du photosystème I</i>	25
3.2. <i>Le centre réactionnel du photosystème I</i>	26
3.3. <i>Absorption et transfert de l'énergie lumineuse du photosystème I</i>	26
3.4. <i>Mesure de l'activité du P700</i>	27
4. DISTRIBUTION DE L'ÉNERGIE ENTRE LES DEUX PHOTOSYSTÈMES	31
5. LES RÉACTIONS BIOCHIMIQUES DE LA PHOTOSYNTHÈSE	33
6. LES ESPÈCES RÉACTIVES DE L'OXYGÈNE (ERO) INDUIT PAR LE TRANSPORT D'ÉLECTRONS PHOTOSYNTHÉTIQUE	34
7. EFFETS DES MÉTAUX SUR LA PHOTOSYNTHÈSE	37
8. LES NANOPARTICULES MÉTALLIQUES	43
 <b>CHAPITRE II PROJET DE RECHERCHE : APPLICATION DES PARAMÈTRES PHOTOSYNTHÉTIQUES DANS L'ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ DES NANOPARTICULES D'OXYDE DE CUIVRE ENCAPSULÉES ET DU DICHROMATE CHEZ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i></b>	 <b>48</b>
 <b>CHAPITRE III EFFECT OF CORE SHELL COPPER OXIDE NANOPARTICLES ON CELL CULTURE MORPHOLOGY AND PHOTOSYNTHESIS (PHOTOSYSTEM II ENERGY DISTRIBUTION) IN THE GREEN ALGA, <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>.</b>	 <b>51</b>
1. RÉSUMÉ	52
2. ABSTRACT	53
3. INTRODUCTION	54
4. MATERIALS AND METHODS	56
4.1. <i>Algal culture</i>	56
4.2. <i>Core-shell copper oxide preparation and its characterization</i>	56

4.3.	<i>Algal exposure to core shell copper oxide nanoparticles (CS-CuO-NP)</i>	57
4.4.	<i>Using of ROS formation indicator</i>	57
4.5.	<i>Measurements of rapid polyphasic fluorescence rise of chlorophyll a as indicator of PSII electron transport activity</i>	58
4.6.	<i>Data analysis and statistics</i>	59
5.	RESULTS AND DISCUSSION	59
6.	CONCLUSIONS	61
7.	ACKNOWLEDGMENT	62
8.	REFERENCES	62

#### **CHAPITRE IV INHIBITION OF PHOTOSYNTHETIC ELECTRON TRANSPORT IN *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* BY DICHROMATE EFFECT ALTERS ENERGY DISSIPATION PROCESSES DEPENDANT TO PSII AND PSI ACTIVITIES**

74

1.	RÉSUMÉ	75
2.	ABSTRACT	76
3.	INTRODUCTION	77
4.	MATERIALS AND METHODS	78
4.1.	<i>Algae culture</i>	78
4.2.	<i>Dichromate treatment</i>	79
4.3.	<i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting</i>	79
4.4.	<i>Chlorophyll a fluorescence and PSI transmittance measurement</i>	79
4.5.	<i>HPLC analysis</i>	81
4.6.	<i>Data analysis and statistic</i>	81
5.	RESULTS AND DISCUSSION	81
6.	ACKNOWLEDGEMENTS	84
7.	REFERENCES	85

#### **CHAPITRE V CONCLUSION**

94

#### **RÉFÉRENCES**

97

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Structure schématique d'un chloroplaste présentant les différents compartiments (d'après Buchanan, 2000). .....	5
Figure 1.2 : Disposition schématique des transporteurs d'électrons dans la membrane du thylacoïde. Les complexes membranaires sont les photosystèmes II et I (PSII et PSI), le cytochrome $b_6f$ (Cyt $b_6f$ ) et l'ATP synthétase. Ils sont reliés par la plastoquinone (PQ) et la plastocyanine (PC). Les flèches rouges indiquent le transfert des électrons et les flèches bleues la translocation de protons. Fdx, ferredoxine; FNR, ferredoxine NADP-réductase : EC 1.18.1.2 (d'après Malkin et Niyogi, 2000). Pour les autres abréviations voir dans le texte. ....	6
Figure 1.3: Représentation schématique de la structure du PSII. (D1 et D2 : protéines dominantes du PSII; Mn : tétramère de manganèse associé au dégagement d'oxygène; CP43 et CP47 : protéines de l'antenne interne; Lhcb 1,2,3,4,5 et 6 : protéines de l'antenne périphérique; cyt b559 : cytochrome b559; PQH <sub>2</sub> : plastoquinone réduite; Q <sub>A</sub> : quinone a; Q <sub>B</sub> : quinone b; E et F sont des protéines formant le cytochrome b559; J, K, W, I, L, S, N, H, M, Z, Tc et X sont des sous- unités structurelles du PSII) (d'après Rawn, 1990). ....	8
Figure 1.4: Structure moléculaire des molécules des pigments (A) chlorophylle et (B) carotène. ....	10
Figure 1.5: Spectres d'absorption de différents pigments photosynthétiques (d'après Rawn, 1990). ....	10
Figure 1.6 : A. Les niveaux d'énergie d'une molécule de chlorophylle et ses mécanismes de dissipation (d'après Harbinson et Rosenqvist, 2003). B. Transfert de l'énergie entre les molécules de l'antenne collectrice de lumière (d'après Campbell, 1995). ....	11
Figure 1.7: Voies de dissipation d'énergie de la chlorophylle (Chl) excitée du PSII (Papageorgiou, 1975 ; schéma tiré de Müller et <i>al.</i> , 2001). ....	12
Figure 1.8: Schéma de la formation des états S et la production de protons pendant la photooxydation de l'eau conduisant au dégagement d'O <sub>2</sub> (Joliot et Kok, 1975, Buchanan, 2000). ....	14
Figure 1.9: Schéma en Z des réactions de transfert d'électrons photosynthétique du complexe de dégagement de l'oxygène jusqu'à la formation du pouvoir reducteur (NADPH) via les différents accepteurs et donneur d'électron du PSII, PSI et cyt $b_6f$ , en fonction de leur potentiel d'oxydoréduction. P680 et P700 représentent les centres réactionnels du PSII et du PSI. P680* et P700* sont leur forme excitée par l'absorption de l'énergie lumineuse (hv). Pheo, Q <sub>A</sub> , Q <sub>B</sub> et PQ sont les accepteurs d'électrons du PSII. Cyt $b_H$ , Cyt $b_L$ , FeS et Cyt f sont les différentes sous-unités et cofacteurs du cytochrome $b_6f$ . PC est la plastocyanine qui transporte les électrons du cytochrome $b_6f$ au PSI. A <sub>0</sub> , A <sub>1</sub> , F <sub>x</sub> , F <sub>A</sub> /F <sub>B</sub> et F <sub>D</sub> sont les accepteurs d'électrons du PSI. NADPF	

représente l'enzyme ferrédoxine NADP-réductase qui réduit le  $\text{NADP}^+$  en NADPH (Hill et Bendall, 1960, Whitmarsh, 1998). ..... 15

Figure 1.10: Modèle de la structure du complexe ATP synthétase. Le  $\text{CF}_1$  se compose des cinq sous-unités polypeptidiques  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ . Le  $\text{CF}_0$  est constitué des sous-unités I, II et III (d'après Malkin et Niyogi, 2000). ..... 16

Figure 1.11: Cycle des xanthophylles lors de la régulation de la dissipation d'énergie lumineuse. Enzymes: zéaxanthine époxydase: ZE (EC 1.14.13.90) et violaxanthine dé-époxydase: VDE (EC 1.10.99.3) respectivement (d'après Demming *et al.*, 1987 et Niyogi *et al.*, 1997a). ..... 18

Figure 1.12: Cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne montrant les transitions O-J-I-P, mesurée sur une échelle de temps logarithmique (d'après Strasser *et al.*, 1995). ..... 20

Figure 1.13: Modèle du flux d'énergie lumineuse absorbée par les LHCII (ABS/RC), utilisée pour la séparation de charge ( $\text{TR}_0/\text{RC}$ ) et le transport d'électrons ( $\text{ET}_0/\text{RC}$ ) ou dissipée sous forme de chaleur ( $\text{DI}_0/\text{RC}$ ) (d'après Zrýd *et al.*, 2002). ..... 22

Figure 1.14: Cinétique de fluorescence modulée mesurée à l'aide d'un fluorimètre PAM.  $F_0$  et  $F'_0$ , fluorescence de base pour une plante adaptée à l'obscurité et à la lumière, respectivement;  $F_v$  et  $F'_v$ , fluorescence variable pour une plante adaptée à l'obscurité et à la lumière, respectivement;  $F_M$  et  $F'_M$ , fluorescence maximale pour une plante adaptée à l'obscurité et à la lumière, respectivement;  $Q_N$ , «quenching» non photochimique;  $Q_P$ , «quenching» photochimique (d'après Schreiber *et al.*, 1986). ..... 23

Figure 1.15: Schéma du transport d'électrons via le PSI Les transporteurs d'électrons associés au PSI sont les PC, P700,  $A_0$ ,  $A_1$ ,  $F_x$ ,  $F_A$ ,  $F_B$  et Fd. Les sous-unités protéiques constituant le centre réactionnel du PSI sont indiquées par les lettres L, I, M, G, D, C, E, H, J et K (d'après Malkin et Niyogi, 2000 ; Jansen *et al.*, 2007). ..... 27

Figure 1.16: Spectre de différence entre l'absorption de la forme oxydée et réduite du P700. Les lettres a et b indiquent la ligne de base et le spectre de différence entre  $\text{P700}^+$  et P700, respectivement (d'après Mathis *et al.*, 1988). ..... 28

Figure 1.17: Détermination de la photochimie et de la dissipation d'énergie du PSI par mesure du changement d'absorption à 830 nm : L'oxydation du P700 est caractérisée par un changement positif d'absorbance. 100% P700 red. : P700 à l'état réduit après adaptation à l'obscurité ; 100% P700 ox. : P700 à l'état oxydé quand la plante est exposée au flash saturant en présence d'illumination rouge lointain (735 nm); P700 ox. : portion des centres réactionnels à l'état oxydé; P700red.A et P700 red.A' : centres réactionnels P700 qui peuvent et ne peuvent pas être réduits, respectivement, quand la plante est exposée à un flash saturant en présence de lumière actinique.  $P_0$  : niveau d'absorption lorsque les P700 sont réduits (100% P700 red.);  $P_m$  : niveau



d'absorption lorsque les P700 sont oxydés (100% P700 ox.) ; P : niveau d'absorption induit par une illumination actinique ;  $P_m'$  : niveau d'absorption induit par un flash saturant en présence de lumière actinique ; FS : flash saturant ; RL ; illumination rouge lointain (735 nm) ; LA : illumination actinique (d'après Klughammer et Schreiber, 2008). ....29

Figure 1.18: Schéma de la régulation des changements d'état I et II par l'induction de la phosphorylation des LHCII (d'après Jupin et Lamant, 1999). Les rectangles achurés indiquent la proportion des LHCII mobiles. ....32

Figure 1.19: Schéma représentant les réactions biochimiques de la fixation du CO<sub>2</sub> pendant les différentes étapes du cycle de Calvin (d'après Campbell, 1995). ....34

Figure 1.20: Sites de formation d'ERO pendant la photosynthèse. (A) Pendant le transport des électrons entre le PSII et PSI. (B) Détails de la formation des ERO pendant le transport d'électrons au niveau du PSI. Les flèches noires représentent le transport d'électrons photosynthétique et les flèches rouges représentent la formation d'ERO (d'après Asada, 1994; McKersie et Leshem, 1994). Pour les abréviations voir dans le chapitre. ....36

Figure 1.21: Formation et devenir des ERO induites par les métaux lourds et des réactions enzymatiques (d'après Pinto *et al.*, 2003). SOD: Superoxyde dismutase, CAT: Catalase, GPX: Glutathion peroxydase, APX: Ascorbate peroxydase, GSSG: glutathion oxydé, MDAsc: Monodehydroascorbate. ....42

Figure 1.22: Relation entre l'aire spécifique de surface des particules sphériques ( $m^2 kg^{-1}$ ) et leur taille (nm), exprimée par la même quantité et volume ( $1000 kg m^{-3}$ ) (d'après Navarro *et al.*, 2008a). ..43

Figure 1.23: **A.** Représentation schématique de l'impact des NP depuis leur source jusqu'aux écosystèmes. Une fois produite, les NP pourront prendre différentes voies et se retrouver dans les écosystèmes. Ainsi, les NP pourront interagir avec le milieu abiotique car les conditions environnementales (air, eau, terre) conduiront à des altérations physico-chimiques des NP. Ces altérations seront déterminantes pour l'interaction des NP avec les facteurs biotiques (biodisponibilité pour les organismes) et, conséquemment pour les possibles effets sur les organismes qui pourront avoir un impact sur l'ensemble de l'écosystème. **B.** Schéma présentant les interactions entre les NP et des xenobiotiques (Tox A, Tox B), les ions (SI) ou la matière organique (OM) comme l'acide humique ou les rejets des bactéries, plantes, champignons et la conséquence sur la biodisponibilité pour les organismes vivants (d'après Navarro *et al.*, 2008a). ....45

Figure 3.1: TEM micrograph of core shell polystyrene-copper oxide nanoparticles (bar = 1 micron). ..66

Figure 3.2: Microscopic image of *C. reinhardtii* culture, **A**: control cells and **B**: cells exposed to 0.02 g/L of CS-CuO-NP during 6 h. ....67

- Figure 3.3: The change of granularity of cellular *C. reinhardtii* when it has been exposed to 0.004, 0.01 ( $P<0.05$ ) and 0.02 ( $P<0.05$ ) g/L of CS-CuO-NP. **A**: The ratio granularity versus CS-CuO-NP concentration. **B**: Ratio between distribution of cell granularity and size value. Numbers **1**, **2**, **3** and **4** represent 0 (control), 0.004, 0.01 and 0.02 g/L of CS-CuO-NP respectively.....68
- Figure 3.4: Fluorescence intensity distribution of ROS sensor ( $H_2DCFDA$ ) when *C. reinhardtii* culture exposed 6 h to copper oxide nanoparticles, **A**: the core complex, without polystyrene shell and **B**: shell complex of polystyrene alone without copper oxide nanoparticles. The different distribution represent the control (green line), 0.01 (black line) and 0.02 (red/black line) g/L of CS-CuO-NP .....69
- Figure 3.5: **A**: Fluorescence intensity distribution of ROS sensor ( $H_2DCFDA$ ) when *C. reinhardtii* culture was exposed to 0.01 and 0.02 g/L of core shell copper oxide nanoparticles. **B**: Increase of the relative intensity of ROS sensor fluorescence emission compared to control when algal culture was exposed to 0.004, 0.01 ( $P<0.05$ ) and 0.02 ( $P<0.05$ ) g/L of CS-CuO-NP. **L** and **D** represent light and dark treatments respectively.....70
- Figure 3.6: Changes in total chlorophyll content in *C. reinhardtii* cell when it has been exposed to 0, 0.004, 0.01 ( $P<0.05$ ) and 0.02 ( $P<0.05$ ) g/L of CS-CuO-NP: .....71
- Figure 3.7: The change of chlorophyll *a* fluorescence when *C. reinhardtii* is exposed during 6 h to control (**a**), 0.01 (**b**) and 0.02 (**c**) g/L of CS-CuO-NP. **A** Fluorescence transition J and  $F_M$  during rapid rise of chlorophyll *a* fluorescence. Panel **B** represents linear scale of fluorescence emission for the same treatments. ....72
- Figure 3.8: The change in photosynthetic fluorescence parameter values of  $DI0/RC$ ,  $ABS/RC$  and  $C.A.$  when *C. reinhardtii* is exposed to CS-CuO-NP during 6 h (for more details concerning fluorescence parameters see materials and methods).....73
- Figure 4.1: Chromium effect on D1 protein content, quantum yield of PSII ( $\Phi_{MII}$ ) and PSI ( $\Phi_{MI}$ ) when *C. reinhardtii* was exposed 24 hours to dichromate. Letters indicate significantly different results ( $p > 0.05$ ). .....91
- Figure 4.2: Change of rapid chlorophyll rise of dark adapted samples of *C. reinhardtii* exposed to dichromate for 24h. (A): Rapid rise of fluorescence with transitions O, J, I and P level of fluorescence; numbers represent dichromate concentration used for treatments. Deconvolution of O-P chlorophyll fluorescence rise according to Pospisil and Dau (2002) for control (B), 6  $\mu M$  (C) and 12.5  $\mu M$  (D). ....92
- Figure 4.3: The change of steady state energy dissipation when *C. reinhardtii* was exposed 24h to dichromate. The values of parameters are presented as percentage value participating in PSII and

PSI energy dissipation considered as 100%. For more details, see material and methods. Letters indicate significantly different results ( $p > 0.05$ ). .....93

## LISTE DES TABLEAUX

Table 4.1: The change of growth rate and pigment content of *C. reinhardtii* when exposed 24 hours to dichromate. Letters (a, b, and c) indicates significantly different results as determined by Student t test. 89

Table 4.2: The change of rapid chlorophyll a fluorescence induction parameters when *C. reinhardtii* was exposed 24h to dichromate. For more details, see material and methods. Letters indicate significantly different results ( $p > 0.05$ ). 90

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

$A_0, A_1$ :	Accepteurs primaire et secondaire d'électrons du PSI
ADP :	Adénosine diphosphate
ATP :	Adénosine triphosphate
CDO :	Complexe de dégagement d'oxygène
CS-CuO-NP :	Nanoparticule d'oxyde de cuivre encapsulée
Chl <i>a</i> :	Chlorophylle <i>a</i>
Chl <i>b</i> :	Chlorophylle <i>b</i>
$^1\text{Chl}, ^3\text{Chl}, ^*\text{Chl}$ :	Chlorophylle à l'état singulet, triplet et excité
$\text{CO}_2$ :	Dioxyde de carbone
$\text{DI}_0/\text{RC}$ :	« <i>Non photochemical energy dissipation per reaction center</i> »
ERO :	Espèces réactives de l'oxygène
$\text{ET}_0/\text{RC}$ :	« <i>Electron transport flux per reaction center</i> »
Fdx :	Ferrédoxine
Fs :	Fluorescence variable induite par une illumination actinique continue
$F_M$ :	Fluorescence maximale induite par un flash saturant après adaptation à l'obscurité
$F'_M$ :	Fluorescence maximale induite par un flash saturant sous illumination actinique continue
$F_0$ :	Fluorescence de base ou morte
$F'_0$ :	Fluorescence de base obtenue par une lumière analytique modulée après illumination dans le rouge lointain (735 nm)
$F_{50\mu\text{s}}, F_{2\text{ms}}, F_{30\text{ms}}$ :	Intensité de fluorescence à 50 $\mu\text{s}$ , 2 et 30 ms
$F_J, F_I$ :	Intensité de fluorescence à la transition J et I
FNR :	Ferrédoxine NADP-réductase (ferrédoxine : $\text{NADP}^+$ oxydoréductase)
$F_v$ :	Fluorescence variable
$F_X, F_A, F_B$ :	Premier, deuxième et troisième groupement $\text{Fe}_4\text{S}_4$ du PSI

h $\nu$	Lumière
KDa :	Kilodalton
LHCI et LHCII : PSI et du PSII	Complexe collecteur de lumière ( <i>Light Harvesting Complexes</i> ) du
NADP, NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée, sous forme réduite
NP :	Nanoparticule
$^1\text{O}_2$ :	Oxygène singulet
P :	Niveau d'absorbance du P700 sous illumination actinique
P <sub>O</sub> :	Niveau d'absorbance du P700 dans l'état maximum réduit
P <sub>m</sub> :	Niveau d'absorbance du P700 dans l'état maximum oxydé
P' <sub>m</sub> :	Niveau d'absorbance du P700 induit par un flash saturant
PAM :	« <i>Pulse Amplitude Modulated</i> »
PC :	Plastocyanine
Phéo :	Phéophytine
Pi :	Phosphate inorganique
PGA :	3 phosphoglycérates
POR	NADPH-Protochlorophyllide Oxydoréductase
PQ, PQH <sub>2</sub> :	Plastoquinone à l'état oxydée et réduite (Plastoquinol)
PSI :	Photosystème I
PSII :	Photosystème II
P680, P680* :	Centre réactionnel du PSII à l'état stable et excité
P700 :	Centre réactionnel du PSI
Q <sub>A</sub> :	Quinone A, accepteur primaire d'électron du PSII
Q <sub>B</sub> :	Quinone B, accepteur secondaire d'électron du PSII
Q <sub>N</sub> :	« <i>quenching</i> » non-photochimique
Q <sub>P</sub> :	« <i>quenching</i> » photochimique
RUBISCO :	Ribulose biphosphate carboxylate (3-phospho-D-glycérate carboxylase)
RuBP :	Ribulose biphosphate
Y(II) :	Dissipation d'énergie sous forme photochimique du PSII

$Y(I)$ :	Dissipation d'énergie sous forme photochimique du PSI
$Y(NA)$ :	Dissipation d'énergie sous forme non-photochimique causée par une limitation du coté accepteur du PSI
$Y(ND)$ :	Dissipation d'énergie sous forme non-photochimique causée par une limitation du coté donneur du PSI
$Y(NO)$ :	Dissipation d'énergie sous forme non-photochimique non-régulée du PSII
$Y(NPQ)$ :	Dissipation d'énergie sous forme non-photochimique régulée du PSII
$Z$ :	Tyrosine, donneur secondaire d'électrons du PSII
$\phi_{MI}$ :	Efficacité photochimique maximale du PSII pour une plante adaptée à l'obscurité
$\phi_{MII}$ :	Efficacité photochimique maximale du PSII pour une plante adaptée à l'obscurité
$\phi'_{MII}$ :	Efficacité photochimique opérationnelle du PSII à l'état stationnaire du transport d'électrons pour une plante adaptée à une illumination actinique continue

## RÉSUMÉ

Les objectifs de notre projet de recherche portaient sur les effets toxiques des nanoparticules d'oxyde de cuivre encapsulées et du dichromate sur la photosynthèse d'une algue verte, *C. reinhardtii*. Le but de cette étude a été d'utiliser l'avantage des paramètres photosynthétiques dans l'évaluation de toxicité de ces polluants. La formation d'espèces réactives de l'oxygène responsable du stress oxydatif, a été étudiée par l'utilisation d'un marqueur, le 2',7'-dichlorodihydrofluoresceine diacetate dont la fluorescence a été suivie par cytométrie en flux. L'étude des effets sur la photochimie du PSII a été étudiée par la fluorescence chlorophyllienne. Dans la seconde partie du projet, nous avons étudié les effets du dichromate sur le transport d'électrons photosynthétiques et les mécanismes de dissipation d'énergie des Photosystèmes II et I. Les propriétés structurelles du photosystème II ont été étudiées par « *Western blot* » et par chromatographie liquide haute performance. Les propriétés fonctionnelles des Photosystème II et I ont été déterminées par la mesure de la cinétique de fluorescence chlorophyllienne et les changements d'absorbance à 830 nm, respectivement.

Pour ces études, l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* a été utilisée comme modèle biologique dans le domaine d'écotoxicologie. Nous avons mis en évidence que la nanoparticule d'oxyde de cuivre encapsulée entraînait l'altération de l'intégrité cellulaire par la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Nous avons constaté que ces espèces réactives de l'oxygène sont responsables de la détérioration des pigments chlorophylliens. Les dommages importants de l'appareil photosynthétique font que l'énergie lumineuse absorbée sera principalement dissipée par les voies non-photochimiques. Cette étude démontre que les nanoparticules d'oxyde de cuivre encapsulées induisent d'importants effets toxiques au niveau photochimique dans la photosynthèse chez l'algue. Nous avons aussi conclu que les rendements photochimiques des Photosystèmes II et I sont diminués par les effets du dichromate. L'inhibition de la photochimie par le dichromate cause une diminution de la dissipation d'énergie par la voie photochimique du Photosystème II et une augmentation de la dissipation d'énergie sous forme non-photochimique non-régulée.

Notre recherche nous permet de conclure que les paramètres photosynthétiques peuvent être utilisés pour l'évaluation de la toxicité des métaux. Les nombreuses mesures des différents paramètres, indicateurs de la photochimie dans la photosynthèse, nous ont permis de démontrer la grande utilité de ces paramètres pour évaluer les risques de toxicité par les métaux étudiés dans notre projet. De plus, les indicateurs de formation d'espèces réactives de l'oxygène ont aussi été démontrés comme excellent indicateur de toxicité.

Mots clés : algues, aluminium, *Chlamydomonas acidophila*, *Chlamydomonas reinhardtii*, dichromate, *Euglena gracilis*, métaux, photosynthèse, Photosystème I, Photosystème II, toxicologie.



## INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le phytoplancton représente l'ensemble des organismes unicellulaires aquatiques capables d'effectuer la photosynthèse. Ce processus physiologique permet la transformation de la lumière en énergie chimique utilisable pour la production de matière organique à partir de matière inorganique, indispensable à la vie dans les écosystèmes aquatiques. L'énergie lumineuse est captée par les pigments photosynthétiques qui entraînent le transport d'un électron, obtenu de la photooxydation de l'eau. L'oxydation des molécules d'eau libère de l'oxygène, un élément fondamental pour tout être vivant. La production de biomasse et d'oxygène démontre l'importance des organismes photosynthétiques, comme les algues, pour le maintien de la vie dans les écosystèmes aquatiques.

Le soleil représente la source naturelle de lumière pour les organismes photosynthétiques terrestres et aquatiques. Cette source lumineuse varie de manière journalière et saisonnière. De plus, la Terre n'est pas irradiée par le soleil de manière uniforme, d'autre part, l'interception de la lumière par les organismes photosynthétiques est influencée par divers facteurs environnementaux : conditions météorologiques, importance du couvert végétal, turbidité de l'eau. Pour pallier ces variations qualitatives et quantitatives de lumière, les organismes photosynthétiques doivent s'adapter afin d'optimiser l'utilisation et la régulation de la lumière pour la photosynthèse. Sous ces conditions, les pigments photosynthétiques, après avoir capté la lumière, peuvent disperser cette énergie suivant différentes voies. Ces mécanismes autorisent l'utilisation de l'énergie pour effectuer la photochimie et conduire ultimement à la formation de matière organique. L'excédant d'énergie, ou dans l'éventualité d'un dysfonctionnement des voies photochimiques, sera dissipée par des voies non-photochimiques sous forme de chaleur, de photons (fluorescence) ou, dans les cas extrêmes, d'un transfert d'énergie directement à l'oxygène.

Un dysfonctionnement de la photosynthèse peut survenir sous différentes conditions environnementales. Ainsi, les voies photochimiques peuvent être affectés par plusieurs facteurs comme l'intensité de la lumière, la température, les nutriments et les xénobiotiques. La présence excessive de ces derniers dans l'environnement est principalement liée à

l'activité anthropique. De nombreux métaux sont des éléments essentiels à l'activité métabolique cellulaire lorsqu'ils sont à l'état de trace. Cependant, si leur concentration devient trop importante, ils peuvent alors s'avérer toxiques pour l'organisme. Les activités industrielles, par exemple, peuvent augmenter la présence des métaux dans les écosystèmes aquatiques et ainsi affecter les organismes photosynthétiques aquatiques. Les métaux peuvent agir directement sur la photosynthèse en altérant la photochimie, le transport d'électrons photosynthétique, la photo-oxydation de l'eau ou la fixation du carbone. Ils peuvent également affecter les processus photosynthétiques de manière indirecte en favorisant la formation d'espèces réactives de l'oxygène, un composé toxique pour l'organisme. Cependant, la toxicité d'un métal n'est pas uniquement due à sa concentration. En effet, la toxicité d'un métal peut différer en fonction de sa forme qui pourra être sous forme ionique ou sous forme nanoparticulaire. La toxicité des métaux sous forme ionique est largement documentée, mais certains restent encore méconnus dans leur mécanisme d'action sur le processus photosynthétique. D'autre part, les formes nanoparticulaires restent très peu documentées, du fait de leur relativement récente utilisation dans de nombreux domaines. Ainsi, la compréhension des mécanismes d'actions ou la mise en évidence des effets des deux formes métalliques sur la photosynthèse ou le métabolisme général d'un organisme photosynthétique aquatique demeure un point fondamental important pour le développement des connaissances et de la gestion des problématiques environnementales.

L'objet de ce travail de recherche consiste à cerner dans un premier temps les effets nocifs de l'oxyde de cuivre nanoparticulaire sur la photochimie, la formation d'espèces réactives de l'oxygène et les effets sur la morphologie d'une culture cellulaire d'une algue verte et dans un second temps, les effets du dichromate sur la dissipation d'énergie sous forme photochimique et non-photochimique. Les effets de l'inhibition de ces métaux sur la dissipation d'énergie dans la photosynthèse vont être investigués pour comprendre l'influence entre les réactions photochimiques inhibées par les métaux et les conséquences sur les différentes voies de dissipation d'énergie. Dans cet objectif, il est important que le rôle de certaines voies de dissipation d'énergie, comme le cycle des xanthophylles ou la formation d'espèces réactives de l'oxygène, soit abordé lors de l'exposition des algues aux métaux. Dans ce contexte,

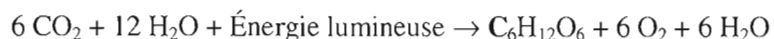
l'étude des paramètres photosynthétiques devient un indicateur indispensable à l'interprétation de la toxicité des métaux et de leur impact sur l'environnement.

## CHAPITRE I

### LA PHOTOSYNTHÈSE

#### 1. INTRODUCTION

La photosynthèse est un ensemble de réactions permettant aux organismes photosynthétiques (algues, plantes supérieures et certaines bactéries) de convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique utilisable pour la synthèse de matière organique. Lors de ce processus, la matière organique ( $C_6H_{12}O_6$ ) est obtenue suite à la fixation du dioxyde de carbone. Cette fixation est rendue possible grâce à l'ensemble des réactions produisant le pouvoir réducteur (NADPH) et la source d'énergie (ATP) issue, à la base, de la photolyse de l'eau associée à un dégagement d'oxygène. La photosynthèse se résume généralement par l'équation suivante (Whitmarsh et Govindjee, 1999) :



La photosynthèse se divise en deux phases, appelées la phase claire et la phase sombre. La phase claire, ou lumineuse, correspond à l'ensemble des réactions photochimiques permettant la conversion de la lumière en énergie chimique. Ces réactions photochimiques sont caractérisées par un transport d'électrons et par l'établissement d'un gradient de protons vers l'intérieur du thylacoïdes, ce qui permet ultimement la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP) et de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). La phase sombre est appelée ainsi, du fait qu'elle est indépendante de la lumière et est caractérisée par un ensemble de réaction biochimique appelé le Cycle de Calvin. Dans cette phase, l'ATP et le NADPH sont utilisés pour la transformation du  $\text{CO}_2$  en glucides (Blankenship, 2002).

La photosynthèse a lieu dans un organite spécialisé appelé chloroplaste dont la structure et les fonctions sont largement documentées et connues (Figure 1.1) (Mustárdy et Garab, 2003 ; Shimoni *et al.*, 2005). Cet organite est défini par une bicouche lipidique qui forme la membrane du chloroplaste. Elle permet de séparer le stroma (milieu intrachloroplastique) et le cytoplasme cellulaire. Un ensemble de transport actif permet de véhiculer le dioxygène, le dioxyde de carbone, des ions ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  et  $H^{+}$ ), des glucides ainsi que l'ensemble des enzymes participant aux processus photosynthétiques.

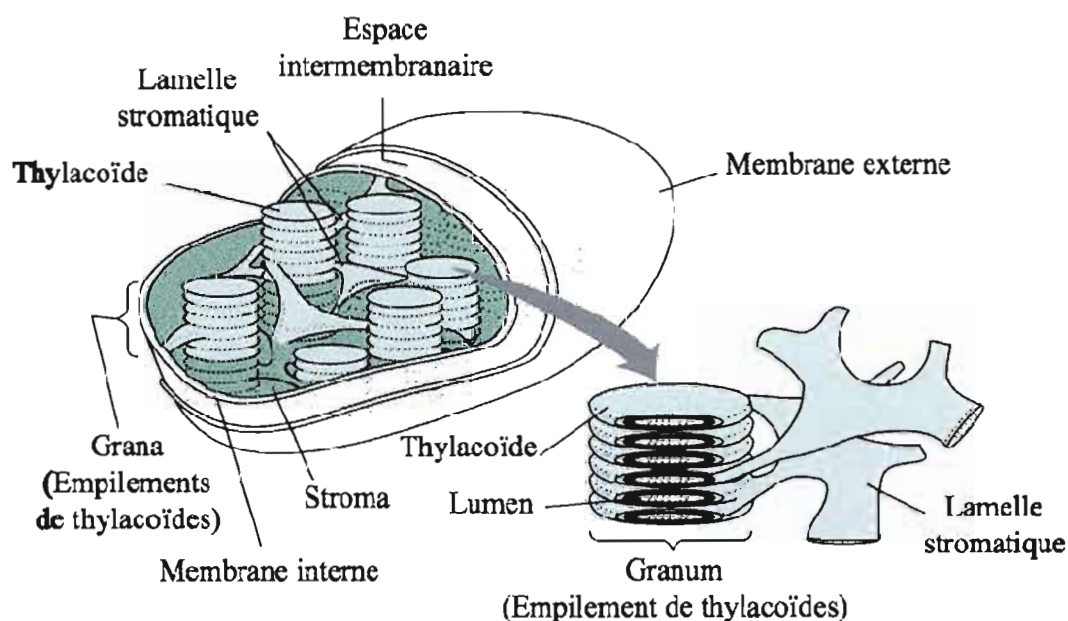


Figure 1.1: Structure schématique d'un chloroplaste présentant les différents compartiments (d'après Buchanan, 2000).

L'intérieur du chloroplaste contient des systèmes membranaires, ressemblant à des vésicules, appelés les thylacoïdes qui peuvent s'empiler et former des granum. Les thylacoïdes non-empilée forme les lamelles du stroma reliant ainsi plusieurs granas. Le thylacoïde est composé d'une membrane (bicouche lipidique) séparant le stroma du lumen. Cette membrane porte l'ensemble des structures pigment-proteines responsables de l'absorption de la lumière, du transport d'électron et de protons permettant la phase lumineuse de la photosynthèse (Mustárdy et Garab, 2003 ; Dekker et Boekema, 2005). Les complexes permettant la première étape de la photosynthèse sont (Figure 1.2):

- Les antennes collectrices de lumière des Photosystèmes II (LHCII ou Lhcb) et I (LHCI ou Lhca) qui sont composées de pigments associés à des unités protéiques membranaires.
- Les centres réactionnels des photosystèmes II (PSII ou P680) et I (PSI ou P700) où s'effectuent les réactions photochimiques primaires à partir de l'énergie d'excitation transférée par les LHCII et LHCI.
- Un ensemble de transporteurs d'électrons entre le PSII et le PSI : les plastoquinones (PQ), le complexe cytochrome  $b_6f$  et les plastocyanines (PC).
- Un système enzymatique transmembranaire, l'ATP synthétase, permettant la synthèse d'ATP par un flux de protons entre le *lumen* et le *stroma*.

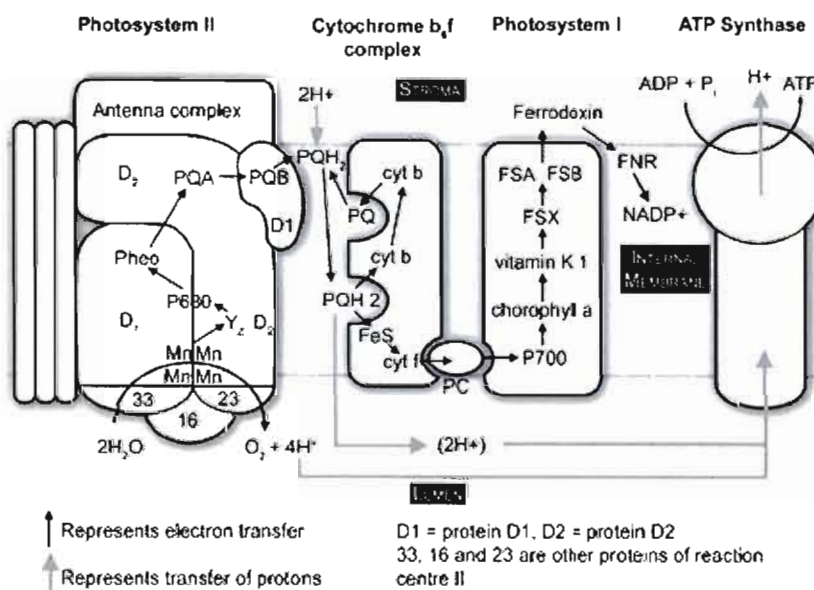


Figure 1.2 : Disposition schématique des transporteurs d'électrons dans la membrane du thylacoïde. Les complexes membranaires sont les photosystèmes II et I (PSII et PSI), le cytochrome  $b_6f$  (Cyt  $b_6f$ ) et l'ATP synthétase. Ils sont reliés par la plastoquinone (PQ) et la plastocyanine (PC). Les flèches rouges indiquent le transfert des électrons et les flèches bleues la translocation de protons. Fdx, ferredoxine; FNR, ferredoxine NADP-réductase : EC 1.18.1.2 (d'après Malkin et Niyogi, 2000). Pour les autres abréviations voir dans le texte.

Le photosystème II se retrouve principalement au niveau des granas alors que le photosystème I et l'ATP synthétase se retrouvent au niveau des lamelles du stroma. Le cytochrome  $b_6f$  sera présent sur les deux types de thylacoïdes (Hauska *et al.*, 1996).

## 2. LE PHOTOSYSTÈME II

### 2.1. Le complexe antennaire du photosystème II

Le complexe antennaire du PSII est constitué d'un ensemble de pigment, principalement de la chlorophylle *a*, il se divise en deux parties interne et périphérique. L'antenne interne permet le transfert de l'énergie lumineuse vers le centre réactionnel. Elle est donc fortement liée au centre réactionnel du PSII et est constituée de deux protéines (CP43 et CP47) auxquelles sont associées environs 50 molécules de chlorophylle *a* et une dizaine de molécules de  $\beta$ -carotène (Barber et Kuhlbrandt, 1999).

L'antenne périphérique est aussi composée de plusieurs complexes pigments-protéines (CP29 ou Lhcb4, CP26 ou Lhcb5 et CP24 ou Lhcb6) qui sont combinés à des molécules de chlorophylle *a* et *b*, ainsi que plusieurs types de caroténoïdes comme la lutéine, la violaxanthine, la néoxanthine et la zéaxanthine, voir Figure 1.3 et 1.4 (Bassi *et al.*, 1997). La composition pigmentaire et la taille des antennes périphériques peuvent varier selon les conditions lumineuses auxquelles les plantes sont exposées (Horton *et al.*, 1996). Le complexe antennaire LHCII (ou Lhcb) contient 50 à 60 % de la quantité totale de chlorophylles *a* et *b*, cette dernière est par conséquent l'antenne principale (Thornber *et al.*, 1991). Elle se divise en trois sections désignées par Lhcb 1, 2 et 3 (Green et Durnford, 1996). Les complexes protéines-pigments Lhcb4, Lhcb5 et Lhcb6, contiennent 5 à 10 % de la Chl totale liée au PSII (Barber et Kuhlbrandt, 1999). Ces protéines sont situées à la périphérie du LHCII et permettent le transfert de l'énergie d'excitation du LHCII au centre réactionnel du PSII via les CP43 et CP47 (Bassi *et al.*, 1997).

### 2.2. Le centre réactionnel du photosystème II

Le centre réactionnel permet, via la séparation de charge, le transfert d'un électron provenant du complexe de dégagement d'oxygène, vers le premier accepteur d'électron, la phéophytine (Dekker et Van Grondelle, 2000). Le centre réactionnel du PSII est constitué de deux protéines structurales, D1 et D2, qui stabilisent les pigments et les transporteurs d'électrons liés au PSII. Le cœur du centre réactionnel est une paire spéciale de Chl *a* (P680) permettant



la séparation de charge et qui possède une absorption maximale de la lumière à une longueur d'onde de 680 nm d'où son nom (Govindjee et Coleman, 1990).

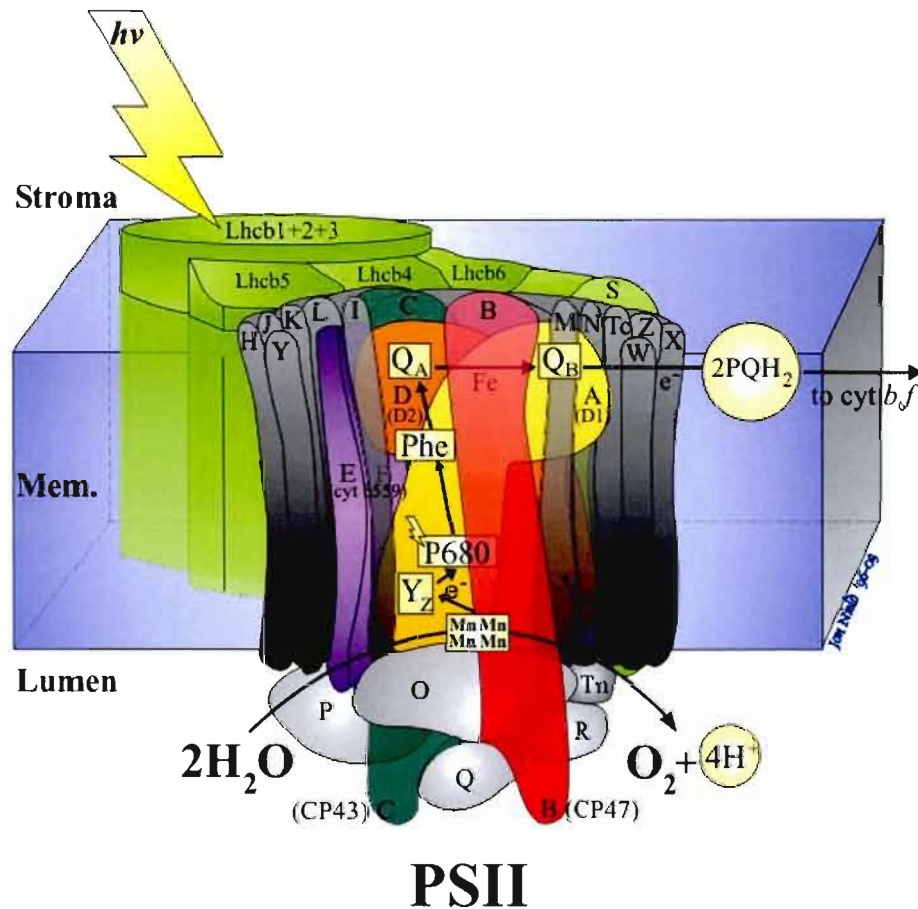


Figure 1.3: Représentation schématique de la structure du PSII. (D1 et D2 : protéines dominantes du PSII; Mn : tétramère de manganèse associé au dégagement d'oxygène; CP43 et CP47 : protéines de l'antenne interne; Lhcb 1,2,3,4,5 et 6 : protéines de l'antenne périphérique; cyt b559 : cytochrome b559; PQH<sub>2</sub> : plastoquinone réduite; Q<sub>A</sub> : quinone a; Q<sub>B</sub> : quinone b; E et F sont des protéines formant le cytochrome b559; J, K, W, I, L, S, N, H, M, Z, Tc et X sont des sous- unités structurales du PSII) (d'après Rawn, 1990).

### 2.3. Le complexe de dégagement d'oxygène

Le complexe de dégagement d'oxygène, permettant la photolyse de l'eau, est un ensemble d'enzyme composé d'un tétramère de manganèse et de trois polypeptides (33, 24 et 17 kDa) (Figure 1.3) (De Las Rivas *et al.*, 2004). La présence de ce complexe est essentielle pour la



stabilité et le fonctionnement adéquats du centre réactionnel du PSII. Le polypeptide de 33 kDa permet essentiellement le maintien de la stabilité du tétramère de manganèse, la liaison des ions  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Ca}^{2+}$  au système de photolyse de l'eau (Miyao et Murata, 1984 ; Heredia et De Las Rivas, 2003 ; Popelkova *et al.*, 2006). Il préserve également la stabilité des protéines CP47, CP43, D1 et 17 kDa au sein du complexe PSII (Yi *et al.*, 2005). Les polypeptides de 24 kDa et 17 kDa permettent un rendement optimal de l'oxydation de l'eau où les cofacteurs nécessaires sont les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Cl}^-$  (Seidler, 1996 ; Haumann et Jung, 1999 ; Wincencjusz *et al.*, 1999).

#### **2.4. Absorption de l'énergie lumineuse**

Les pigments (Chl *a*, Chl *b* et caroténoïdes) présent dans les antennes du PSII collectent la lumière. Chaque type de pigments possède un maximum d'absorption pour une longueur d'onde donnée. Cette spécificité permet de couvrir l'ensemble des longueurs d'onde du visible, ainsi l'appareil photosynthétique exploite optimalement la lumière qu'il absorbe (Govindjee and Govindjee, 1974). Lorsqu'un pigment photosynthétique absorbe un photon, il passe rapidement ( $10^{-15}$  s) d'un état fondamental à un état excité, possédant un plus haut niveau d'énergie.

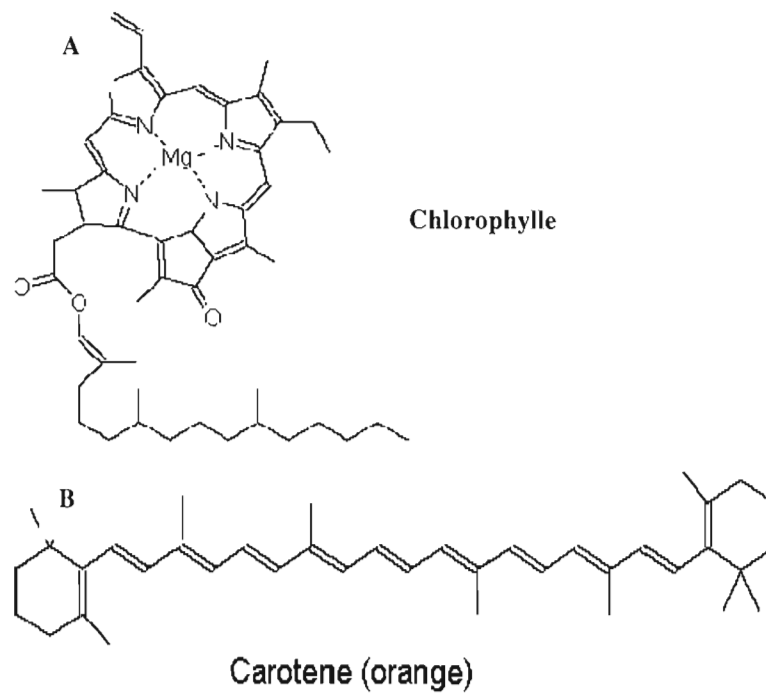


Figure 1.4: Structure moléculaire des molécules des pigments (A) chlorophylle et (B) carotène.

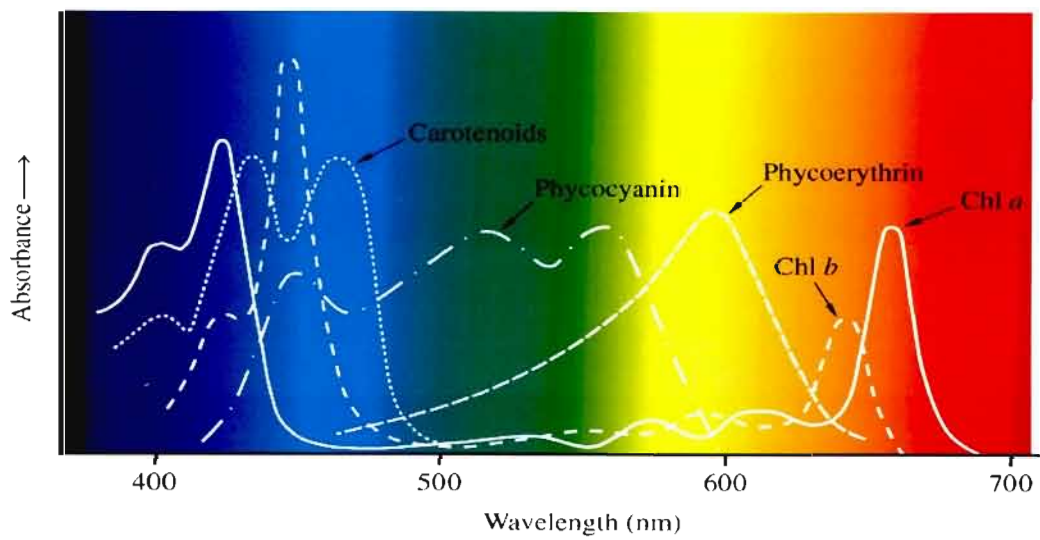


Figure 1.5: Spectres d'absorption de différents pigments photosynthétiques (d'après Rawn, 1990).

Les pigments chlorophylliens possèdent deux maximums d'absorption (Figure 1.5), l'un dans le bleu et l'autre dans le rouge, cela permet leur excitation à deux niveaux d'énergie. Le premier état singulet excité ( $^1\text{Chl}^*$ ) se forme par absorption d'un photon de lumière rouge et le second état singulet excité par un photon de lumière bleue (Figure 1.6.A). Au niveau des antennes collectrices de lumière, l'énergie d'une molécule de chlorophylle excitée est transférée à une molécule voisine aléatoirement par résonance jusqu'au centre réactionnel (Figure 1.6.B). L'énergie ne pouvant pas être dissipée par le centre réactionnel sous forme de photochimie va être dissipée par des voies connexes permettant ainsi de conserver les molécules de chlorophylle à un état stable.

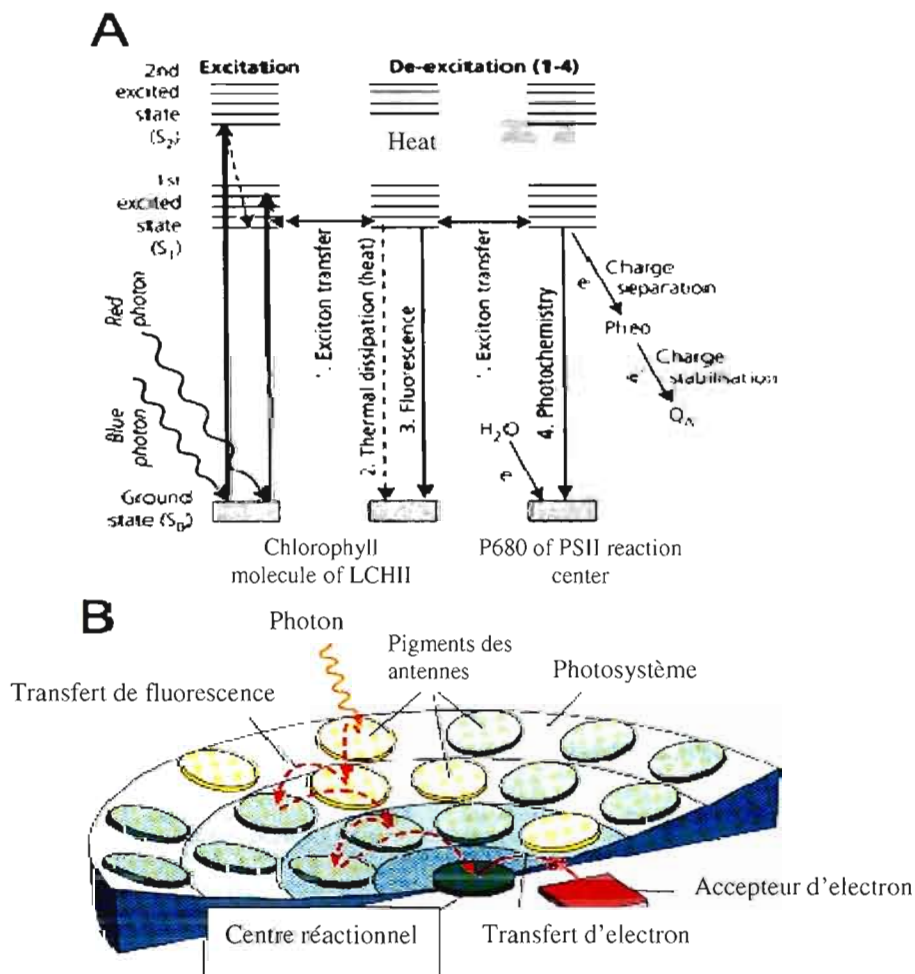


Figure 1.6 : **A.** Les niveaux d'énergie d'une molécule de chlorophylle et ses mécanismes de dissipation (d'après Harbinson et Rosenqvist, 2003). **B.** Transfert de l'énergie entre les molécules de l'antenne collectrice de lumière (d'après Campbell, 1995).

## Dissipation d'énergie au niveau du photosystème II

Il existe 4 voies de dissipation d'énergie au niveau du PSII (Figure 1.7) :

- 1) Photochimique
- 2) non-photochimique (chaleur).
- 3) Fluorescence
- 4) Formation d'espèces réactives d'oxygène (ERO)

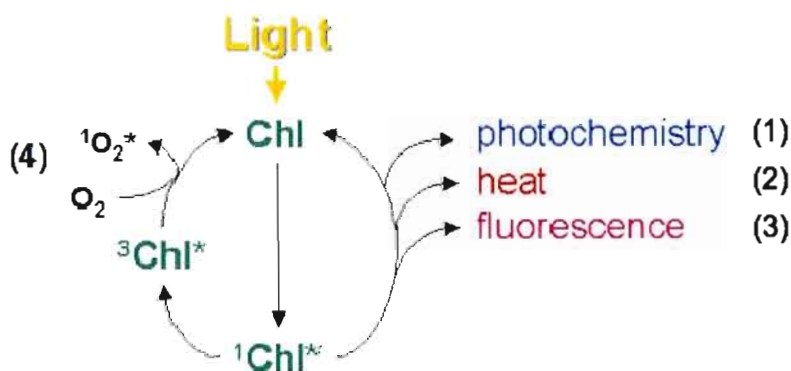


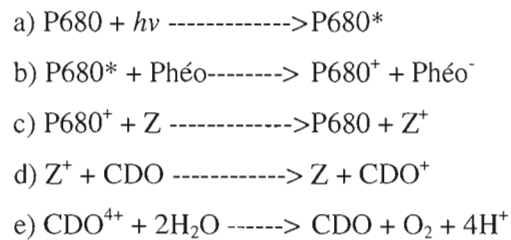
Figure 1.7: Voies de dissipation d'énergie de la chlorophylle (Chl) excitée du PSII (Papageorgiou, 1975 ; schéma tiré de Müller et *al.*, 2001).

Les voies de dissipation de l'énergie sont interreliées, ainsi si l'une de ces voies diminue cela entraîne un changement participatif des autres voies.

### 2.5. Séparation de charge dans la réaction photochimique primaire du PSII

La lumière entraîne l'excitation du P680 qui passe à l'état excité  $\text{P680}^*$ , qui via la séparation de charge permet le transfert d'un électron à l'accepteur primaire du PSII, la phéophytine (Phéo). A ce stade le P680 sera dans son état oxydé ( $\text{P680}^+$ ) pouvant, ainsi accepter un nouvel électron du résidu tyrosine (Z) connu comme le donneur primaire du PSII. Ce dernier sera alors dans un état oxydé ( $\text{Z}^+$ ) ce qui lui permet d'accepter un nouvel électron du complexe de dégagement d'oxygène (CDO).

La séparation de charge est présentée par les équations suivantes:



Cet ensemble de réactions est valable pour l'absorption d'un photon entraînant une séparation de charge. Cependant, quatre charges positives doivent s'accumuler sur le CDO, comme conséquence de quatre séparations de charge (4 photons), pour la photooxydation de l'eau et la formation d'une molécule d'oxygène (Dekker et Van Grondelle, 2000).

La photooxydation de l'eau permet de fractionner deux molécules d'eau pour obtenir une molécule d'O<sub>2</sub> et quatre protons qui sont libérés dans le *lumen* du thylacoïde contribuant à la formation du gradient de protons utilisés pour la formation d'ATP. La photooxydation de l'eau entraîne la libération de dioxygène suite à un cycle de 5 étapes en passant par les états « S » (Figure 1.8.) dans lequel les 4 premiers états sont liés aux réactions photochimiques primaire du PSII (Kok *et al.*, 1970). Le transfert d'un électron du CDO vers le P680 correspond au passage d'un état « S » à un autre, par succession de S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> et S<sub>4</sub>. Le retour à l'état S<sub>0</sub> se fait par le fractionnement de deux molécules d'eau (photolyse ou photooxydation) pour obtenir une molécule d'O<sub>2</sub> (figure 1.8). Les quatre électrons extraits de cette étape vont permettre le transport d'électron entre le PSII et le PSI.

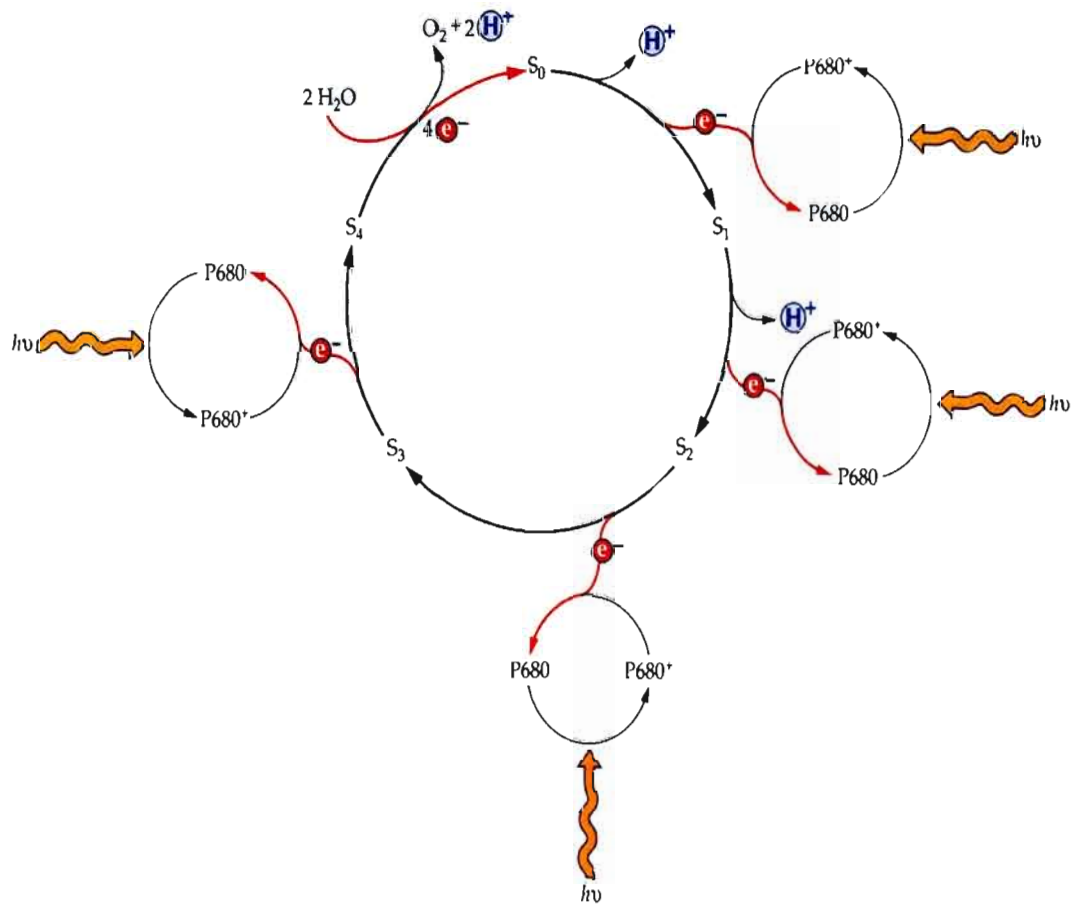


Figure 1.8: Schéma de la formation des états S et la production de protons pendant la photooxydation de l'eau conduisant au dégagement d'O<sub>2</sub> (Joliot et Kok, 1975, Buchanan, 2000).

## 2.6. Le transport transmembranaire des électrons

La première séparation de charge du PSII initie le transport d'électron et la réduction de la phéophytine qui transférera son électron vers la quinone A (Q<sub>A</sub>) puis à la quinone B (Q<sub>B</sub>), qui sera réduite deux fois. Les plastoquinones permettent le transfert d'électron du PSII vers le cytochrome b6f, en acceptant les électrons de Q<sub>B</sub> et en entraînant un gradient de protons du stroma vers le lumen (Baker *et al.*, 2007). La réduction de la PQ induit une modification de la configuration stéréochimique de la molécule. Les deux charges négatives de la PQ sont

neutralisées par deux protons ( $\text{PQH}_2$ ) en provenance du *stroma*. Les protons associés aux  $\text{PQH}_2$  seront libérés dans le *lumen* du thylacoïde après transfert des électrons au Cyt b6f (Heller *et al.*, 1998). La  $\text{Q}_\text{B}$  devient à nouveau disponible et peut donc renouveler le processus de transfert aux plastoquinones (Whitmarsh et Govindjee, 1999). En relarguant les protons dans lumen, les PQ transfèrent leurs deux électrons au cyt b6f qui seront transmis aux plastocyanine (donneur d'électron du PSI). En considérant les différences dans le potentiel d'oxydoréduction des transporteurs d'électrons associés au PSII et au PSI, le transport linéaire d'électrons peut être présenté comme un schéma en Z selon le modèle de Hill et Bendall (Figure 1.9).

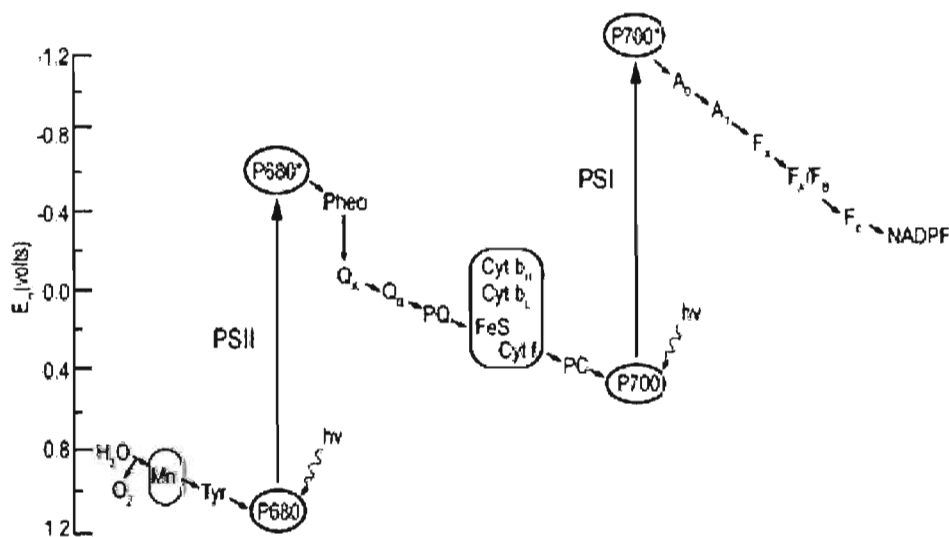


Figure 1.9: Schéma en Z des réactions de transfert d'électrons photosynthétique. Ce schéma présente le parcours des électrons depuis le complexe de dégagement de l'oxygène jusqu'à la formation du pouvoir reducteur (NADPH), via les différents accepteurs et donneurs d'électron du PSII, PSI et cyt b6f. Ces différents composants sont présentés en fonction de leur potentiel d'oxydoréduction. P680 et P700 représentent les centres réactionnels du PSII et du PSI. P680\* et P700\* sont leur forme excitée par l'absorption de l'énergie lumineuse ( $h\nu$ ). Pheo,  $\text{Q}_\text{A}$ ,  $\text{Q}_\text{B}$  et PQ sont les accepteurs d'électrons du PSII. Cyt b<sub>H</sub>, Cyt b<sub>L</sub>, FeS et Cyt f sont les différentes sous-unités et cofacteurs du cytochrome b<sub>6</sub>f. PC est la plastocyanine qui transporte les électrons du cytochrome b<sub>6</sub>f au PSI.  $\text{A}_0$ ,  $\text{A}_1$ ,  $\text{F}_\text{x}$ ,  $\text{F}_\text{a}/\text{F}_\text{b}$  et  $\text{F}_\text{D}$  sont les accepteurs d'électrons du PSI. NADPF représente l'enzyme ferrédoxine NADP-réductase qui réduit le  $\text{NADP}^+$  en NADPH (Hill et Bendall, 1960, Whitmarsh, 1998).

## 2.7. La photophosphorylation

Le gradient de protons est lié au transport d'électron linéaire par le complexe de dégagement d'oxygène et les plastoquinones. Le gradient de proton va être utilisé pour la production d'ATP via la pompe ATP synthétase (ATP Phosphohydrolase, EC 3.6.3.14). Cette sortie de proton du thylacoïde permet la réaction de l'adénosine diphosphate (ADP) et du phosphate inorganique ( $P_i$ ) provenant du stroma (Mitchell, 1974 ; Boyer, 1993). L'enzyme ATP synthétase est constituée de deux parties (figure 1.10) :

- une partie hydrophobe  $CF_0$  qui permet le passage des protons de l'intérieur vers l'extérieur des thylacoïdes.
- une partie hydrophile  $CF_1$ , associée au *stroma*, qui contient les sites catalytiques participant à la synthèse d'ATP (Lehninger *et al.*, 1994).

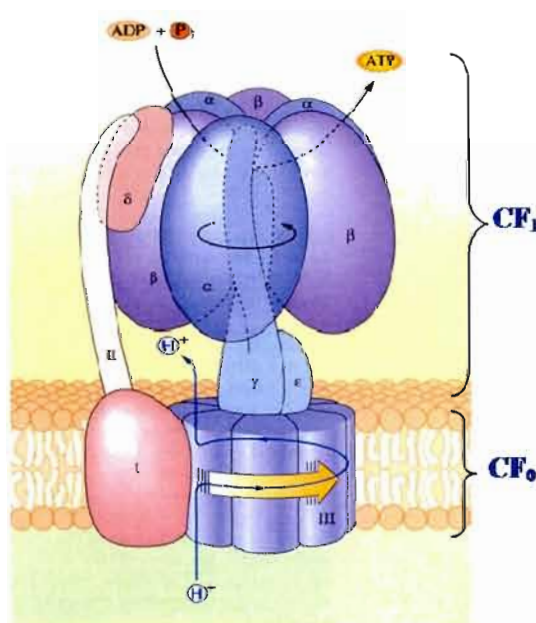


Figure 1.10: Modèle de la structure du complexe ATP synthétase. Le  $CF_1$  se compose des cinq sous-unités polypeptidiques  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ . Le  $CF_0$  est constitué des sous-unités I, II et III (d'après Malkin et Niyogi, 2000).



## 2.8. Dissipation d'énergie sous forme de chaleur

Une partie de l'énergie absorbée par les antennes collectrices de lumière est dissipée, sous forme non-photochimique, en chaleur. Dans la photosynthèse, la dissipation d'énergie par la voie non-photochimique peut montrer une variation importante qui représente une part des mécanismes de protection de l'appareil photosynthétique contre un excès d'énergie lumineuse absorbée par les pigments (Niyogi, 2000). Il a été déterminé que la dissipation d'énergie en excès sous forme de chaleur constitue la principale voie de régulation de l'énergie non dommageable dans les photosystèmes (Horton *et al.*, 1996).

Il existe différentes voies permettant la dissipation d'énergie sous forme non-photochimique, indispensable au bon fonctionnement de la photosynthèse, qui vont différer selon l'espèce prise en compte et les conditions environnementales (Demmig-Adams and Adams, 2006). Le cycle des xanthophylles est le mécanisme le plus important pour la dissipation d'énergie sous forme de chaleur. Ce cycle est relatif à trois pigments caroténoïdes qui sont la violaxanthine, l'antheraxanthine et la zéaxanthine. Via une catalyse enzymatique de la violaxanthine dé-époxydase (violaxanthine : ascorbate oxydoréductase, EC 1.10.99.3), la violaxanthine sera transformée antheraxanthine puis en zéaxanthine (Figure 1.11.). La zéaxanthine est la forme active qui va accepter l'énergie directement des pigments chlorophylliens et la dissiper sous forme de chaleur (Horton *et al.*, 1994; Demmig-Adams *et al.*, 1996). La liaison de la zéaxanthine avec les complexes protéiques du PSII se fait avec la participation de la protéine PsbS, qui est essentielle à la régulation de la dissipation d'énergie sous forme de chaleur (Niyogi *et al.*, 2004). La protonation de la protéine PsbS suite à l'acidification du lumen induit un changement de conformation au niveau du PSII qui, avec la liaison de la zéaxanthine, permet la dissipation d'énergie sous forme de chaleur. Il a été proposé que ce changement de conformation induit, au niveau du PSII, un transport non-linéaire d'électrons impliquant le cytochrome b559, une sous-unité périphérique du PSII. Ce transport alternatif permettrait de protéger le PSII lors d'un excès de lumière (Poulson *et al.*, 1995).

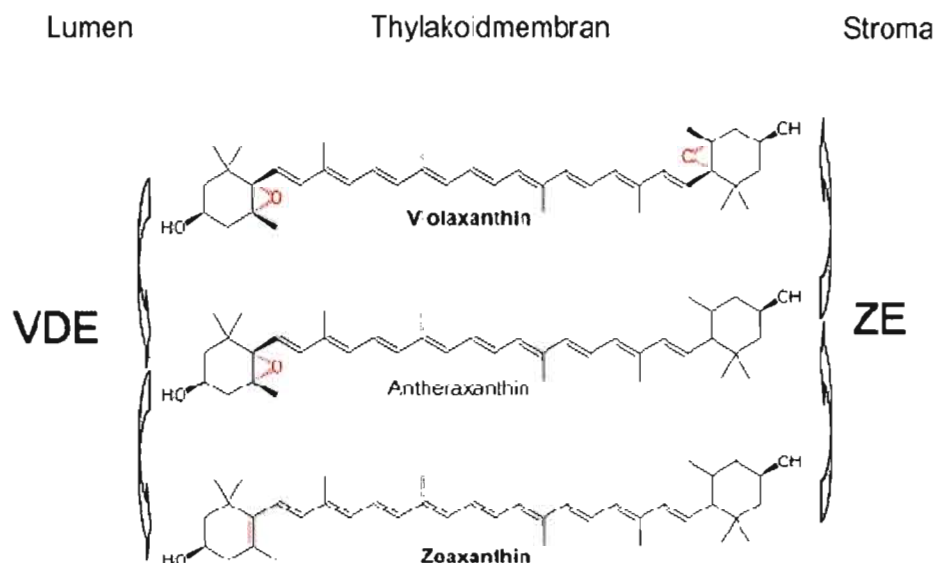


Figure 1.11: Cycle des xanthophylles lors de la régulation de la dissipation d'énergie lumineuse. Enzymes: zéaxanthine époxydase: ZE (EC 1.14.13.90) et violaxanthine dé-époxydase: VDE (EC 1.10.99.3) respectivement (d'après Demming *et al.*, 1987 et Niyogi *et al.*, 1997a).

La zéaxanthine peut être sous forme libre dans la membrane du thylacoïde et agit comme antioxydant contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui entraîne la peroxydation de lipide présent dans les membranes (Moronsito *et al.*, 2003).

## 2.9. Dissipation d'énergie sous forme de fluorescence

Après l'illumination d'une feuille ou des algues, la fluorescence émise par les pigments photosynthétiques montre une intensité variable en fonction du temps connu comme «effet Kautsky» (Kautsky et Hirsh, 1931). Comme mentionnées plus haut, les voies de dissipation peuvent être influencées par plusieurs facteurs environnementaux. Le processus de dissipation d'énergie sous forme de fluorescence a permis l'étude des réactions photochimiques et du transport d'électrons. Une diminution du transfert d'énergie par les voies photochimiques se traduit par l'augmentation de la dissipation sous forme de fluorescence ou de chaleur.

Lorsqu'une molécule de Chl capte un photon, elle passe d'un état stable à un état instable (niveau de haute énergie d'excitation). Pour retourner à un niveau d'énergie plus faible (état plus stable), cette molécule de Chl excitée peut soit transférer son énergie d'excitation à une molécule de Chl voisine qui devient excitée à son tour et ainsi de suite jusqu'au centre réactionnel, soit dissiper cette énergie sous forme de chaleur ou émettre un photon sous forme de fluorescence (contribuant à la fluorescence de base,  $F_0$ ). Lors de la recombinaison de la séparation de charge au niveau du centre réactionnel du PSII défini comme re-réduction du  $P680^+$  par la  $Pheo^-$ , il en résulte une incapacité du  $P680$  à accepter l'énergie en provenance des antennes (Duysens et Sweers, 1963 ; Papageorgiou, 1975). La dissipation d'énergie par la fluorescence sera donc amplifiée puisqu'elle n'est pas utilisée pour la photochimie, cela correspond à la fluorescence variable ( $F_V$ ). La fluorescence variable, sous ces conditions, est directement dépendante de l'état d'oxydoréduction des transporteurs d'électrons du PSII et du PSI. Par conséquent, lorsque l'appareil photosynthétique est exposé à une lumière d'intensité saturante, les  $Q_A$  sont dans un état réduit et induira la dissipation d'énergie par la fluorescence à un niveau maximal ( $F_M$ ). La fluorescence variable dépend des états oxydés ou réduits des accepteurs primaires du PSII, elle est donc dépendante de la capacité photochimique du PSII.

## **2.10. La fluorescence chlorophyllienne : La cinétique rapide**

Lorsqu'une plante est adaptée à l'obscurité, les accepteurs d'électrons des photosystèmes II et I se retrouvent dans leur état oxydé. C'est dans cet état que nous exposons l'organisme photosynthétique à une lumière saturante pour déterminer la photochimie maximale, dépendante du transport des électrons au niveau du PSII en utilisant la variation de la fluorescence chlorophyllienne. En effet, dans ces conditions les différents accepteurs d'électrons seront réduits tour à tour induisant une variation de la fluorescence variable. Il en résultera une augmentation globale de la fluorescence variable entrecoupée de phase de ralentissements qui correspondent aux transitions d'états d'oxydo-réduction des accepteurs d'électron. Cette variation d'intensité de fluorescence est mesurée dans un temps très court (1-6 s.) et permet l'obtention de la cinétique rapide de la fluorescence chlorophyllienne.

Sur une durée de 1 sec, la cinétique rapide a un passage du rendement de fluorescence d'un niveau  $F_0$  au niveau maximal  $F_M$ . Lorsqu'elle est présentée sur une échelle de temps logarithmique, cette cinétique montre les transitions :  $F_0$ ,  $F_J$ ,  $F_I$  et  $F_P$  ( $F_P = F_M$ ). Ces transitions représentent différents états d'oxydoréduction des transporteurs d'électrons associés au PSII. La fluorescence évaluée à 50  $\mu\text{sec}$  d'illumination est considérée comme le rendement de fluorescence  $F_0$  (Strasser et Stirbet, 2001). La phase O-J représente la réduction de l'accepteur primaire d'électrons  $Q_A$  (Neubauer et Schreiber, 1987). Le niveau de fluorescence à la transition I ( $F_I$ ) correspond à la première réduction de  $Q_B$  ( $Q_A^{\cdot-}Q_B^{\cdot-}$ ) (Strasser *et al.*, 1995). La phase I-P reflète une accumulation progressive de  $Q_B$  doublement réduite ( $Q_A^{\cdot-}Q_B^{2\cdot-}$ ) (Strasser et Govindjee, 1991). Donc, le niveau  $F_P$  indique la réduction maximale du PSII, où les PQ sont réduites (Vredenberg, 2000). Après la transition P, le rendement de fluorescence montre une diminution progressive, appelée effet « quenching ». Cette diminution est causée par le transfert des électrons du PSII vers le PSI et le  $\text{NADP}^+$  (Krause et Weis, 1991). Cependant, la transition K (300  $\mu\text{sec}$ ), qui peut apparaître avant la transition J, est caractérisée seulement quand le CDO est inactivé (Strasser, 1997) (Figure 1.12).

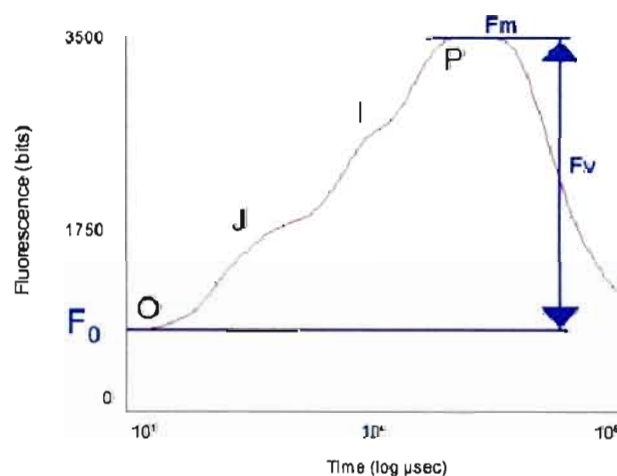


Figure 1.12: Cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne montrant les transitions O-J-I-P, mesurée sur une échelle de temps logarithmique (d'après Strasser *et al.*, 1995).

La cinétique rapide permet d'établir de nombreux paramètres favorisant l'établissement d'indicateur du fonctionnement de la dissipation d'énergie photochimique et non-photochimique du PSII. L'évaluation de ces paramètres est basée sur le rendement de

fluorescence aux transitions O, J, et I, qui apparaissent à 50  $\mu\text{sec}$  ( $F_{50\mu\text{sec}}$ ), 2 msec ( $F_{2\text{msec}}$ ) et 30 msec ( $F_{30\text{msec}}$ ), respectivement. Le temps d'apparition du rendement  $F_p$  peut varier en fonction du temps de 500 msec et plus. Dans notre recherche, nous avons utilisé :

- Le rendement photochimique maximal du PSII,  $\Phi_{MII}$  :

$$\Phi_{MII} = (F_M - F_{50\mu\text{sec}}) / F_M \quad (\text{Strasser et al., 2004})$$

où  $F_{50\mu\text{sec}}$  = rendement de fluorescence considéré comme  $F_0$  et  $F_M$  = rendement de fluorescence maximal (transition P).

- L'absorption de l'énergie lumineuse par les antennes collectrices de lumière (ABS) distribuée par centre réactionnel du PSII actif (RC), ABS/RC :

$$\text{ABS/RC} = M_0 / V_J / \Phi_{MII} \quad (\text{Force et al., 2003})$$

où :  $M_0 = F_{300\mu\text{sec}} - F_{50\mu\text{sec}} / (F_M - F_{50\mu\text{sec}}) \times 0.25$  représente la vitesse initiale de l'induction de la fluorescence variable;  $V_J = F_{2\text{msec}} - F_{50\mu\text{sec}} / F_M - F_{50\mu\text{sec}}$  représente le taux de la réduction de  $Q_A$ .

- La quantité d'énergie lumineuse utilisée pour la séparation de charge du PSII ( $TR_0$ ) par centre réactionnel actif RC représente le ratio  $TR_0 / RC$  :

$$TR_0 / RC = M_0 / V_J \quad (\text{Force et al., 2003})$$

- Le transfert des électrons de  $Q_A^-$  vers les transporteurs d'électrons au-delà de  $Q_A$  ( $ET_0$ ) par centre réactionnel du PSII actif (RC) est le ratio  $ET_0 / RC$  :

$$ET_0 / RC = (M_0 / V_J) \times (1 - V_J) \quad (\text{Force et al., 2003})$$

- La proportion de l'énergie lumineuse absorbée par centre réactionnel du PSII actif qui ne sera pas utilisée pour la photochimie et conséquemment dissipée sous forme de chaleur ( $DI_0$ ) est évaluée par le ratio,  $DI_0 / RC$  :

$$DI_0 / RC = \text{ABS/RC} - M_0 / V_J \quad (\text{Strasser et al., 2000})$$

La figure 1.13 indique comment l'énergie lumineuse est absorbée et utilisée par le PSII, selon la théorie des flux d'énergies dans les membranes biologiques (Strasser et al., 2004).

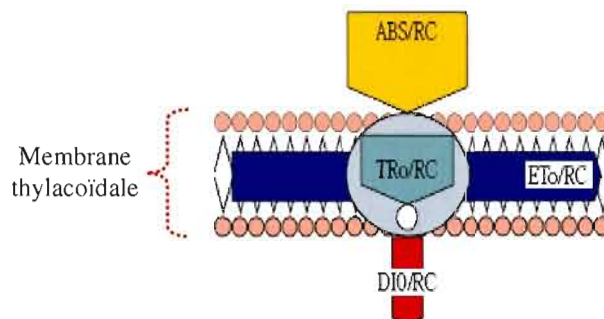


Figure 1.13: Modèle du flux d'énergie lumineuse absorbée par les LHCII (ABS/RC), utilisée pour la séparation de charge (TR<sub>o</sub>/RC) et le transport d'électrons (ET<sub>o</sub>/RC) ou dissipée sous forme de chaleur (DI<sub>o</sub>/RC) (d'après Zrýd *et al.*, 2002).

### 2.11. La fluorescence chlorophyllienne modulée

La mesure de la fluorescence chlorophyllienne modulée permet d'évaluer le fonctionnement du transport d'électrons des PSII et PSI (Rohacek et Bartak, 1999). La fluorimétrie PAM (*Pulse Amplitude Modulated*) est une méthode basée sur l'utilisation de quatre types de lumière comme l'illustre la figure 1.13: une lumière analytique modulée (594 nm), une lumière actinique continue (400-700 nm), une lumière saturante (400-700 nm) et une lumière rouge lointain (735 nm) (Figure 1.14).

L'organisme est adapté à l'obscurité pendant 15 min, afin que les transporteurs d'électrons des PSII et PSI soient dans un état oxydé. Il est ensuite exposé à une lumière dite modulée, insuffisante pour induire la séparation de charge, donc cela permet d'établir la fluorescence de base  $F_0$ . Sous ces conditions, l'application d'un flash saturant permet d'établir le rendement maximal de fluorescence ( $F_M$ ) lorsque tous les centres réactionnels sont réduits. Ce niveau maximal de fluorescence obtenu est utilisé pour évaluer la fluorescence variable ( $F_v = F_M - F_0$ ) comme indicateur de la capacité de transport d'électron du PSII quand la plante est exposée à la lumière saturante. Suite à cela, la plante est exposée à une illumination continue (lumière actinique) qui entraîne les différents processus photosynthétiques. La fluorescence induite par une illumination continue va passer par différentes transitions (P,  $S_1$ ,  $M_1$ ,  $S_2$ ,  $M_2$ ) avant d'atteindre un niveau stable  $F_S$ . La fluorescence variable à l'état

stationnaire ( $F_{VS} = F_S - F_O$ ) est liée à la proportion de centres réactionnels du PSII qui restent réduit pour la plante adaptée à la lumière continue. L'application de flash saturant durant l'adaptation à la lumière permet de déterminer le rendement de fluorescence  $F'_M$ , sous la lumière actinique. Cette lumière est utilisée pour évaluer l'activité fonctionnelle du PSII participant dans le transport d'électrons, connu comme « quenching » photochimique de fluorescence ( $Q_P$ ), et aussi d'évaluer la portion de la diminution de fluorescence qui n'est pas restaurée par le flash saturant, connu comme « quenching » non-photochimique de fluorescence ( $Q_N$ ) qui indique la dissipation d'énergie sous la forme de chaleur. À l'état stationnaire du transport d'électrons, il est possible de déterminer la fluorescence de base ( $F'_O$ ), qui est évaluée quand la lumière actinique est éteinte et que la plante est exposée à une illumination dans le rouge lointain qui induit une oxydation totale des transporteurs d'électrons du PSII (Schreiber *et al.*, 1986; Rohacek et Bartak, 1999).

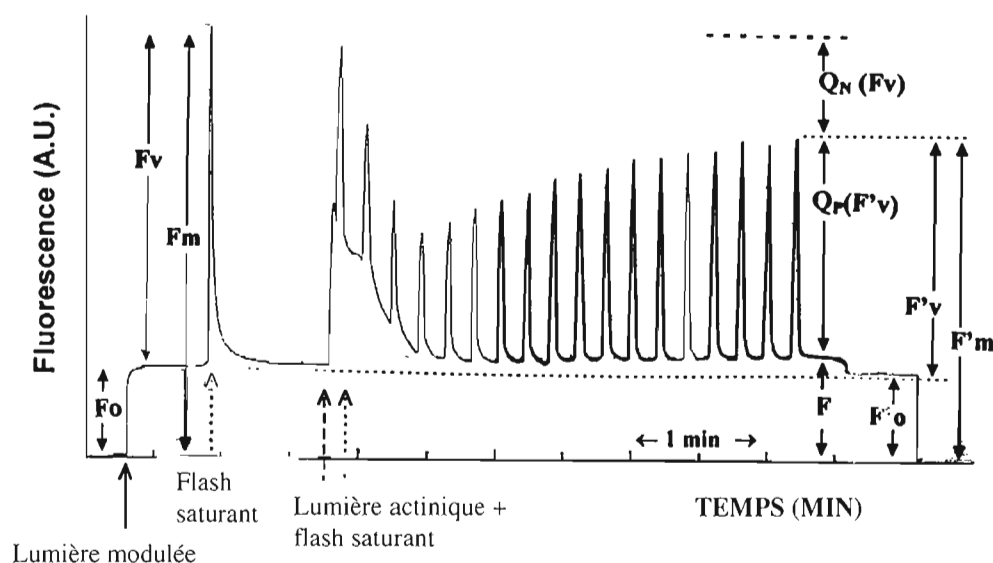


Figure 1.14: Cinétique de fluorescence modulée mesurée à l'aide d'un fluorimètre PAM.  $F_O$  et  $F'_O$ , fluorescence de base pour une plante adaptée à l'obscurité et à la lumière, respectivement;  $F_V$  et  $F'_V$ , fluorescence variable pour une plante adaptée à l'obscurité et à la lumière, respectivement;  $F_M$  et  $F'_M$ , fluorescence maximale pour une plante adaptée à l'obscurité et à la lumière, respectivement;  $Q_N$ , «quenching» non photochimique;  $Q_P$ , «quenching» photochimique (d'après Schreiber *et al.*, 1986).

La mesure de la fluorescence chlorophyllienne modulée permet d'évaluer différents paramètres liés à l'aspect fonctionnel du PSII et à la dissipation de l'énergie lumineuse absorbée. Nous allons présenter plusieurs paramètres :

Le rendement photochimique maximal du PSII,  $\Phi_{MII}$  :

$$\Phi_{MII} = (F_M - F_O) / F_M = F_V / F_M \quad (\text{Butler et Kitajima, 1975})$$

Représente le rendement quantique dépendant du transfert des électrons du P680 à l'accepteur primaire  $Q_A$ .

Le rendement photochimique des PSII ouverts,  $\Phi'_{MII}$  :

$$\Phi'_{MII} = (F'_M - F'_O) / F'_M = F'_V / F'_M \quad (\text{Genty } et al., 1989)$$

représente le rendement photochimique du PSII quand la plante est adaptée à la lumière.  $\Phi'_{MII}$  est un indicateur des centres réactionnels du PSII participants aux réactions photochimiques et au transport d'électrons vers le PSI dans une plante adaptée à la lumière (Rohacek, 2002). Selon Kramer *et al.* (2004), le paramètre  $Y(II)$  est utilisé aussi comme synonyme pour  $\Phi'_{MII}$ .

Le « quenching » photochimique de fluorescence,  $Q_P$  :

$$Q_P = (F'_M - F_S) / (F'_M - F'_O) \quad (\text{Schreiber } et al., 1986)$$

représente l'atténuation, quenching, de fluorescence causée par les réactions photochimiques liées au transport d'électrons. Ce paramètre représente un indicateur des centres réactionnels du PSII participant au transport d'électrons.

Le quenching non-photochimique de fluorescence est causé par plusieurs mécanismes qui se divisent en deux classes : les mécanismes régulés par la plante et les mécanismes non-régulés.

Le « quenching » non-photochimique de fluorescence,  $Q_N$  :

$$Q_N = 1 - [(F'_M - F'_O) / (F_M - F_O)] \quad (\text{Van Kooten et Snel, 1990})$$



représente l'atténuation, quenching, de fluorescence induit par les réactions non-photochimiques. Ce paramètre représente la dissipation d'énergie sous forme non-radiative (Havaux *et al.*, 1991), qui comprend les mécanismes régulés et non-régulés.

La dissipation d'énergie sous forme non-photochimique non-régulée,  $Y(NO)$  :

$$- Y(NO) = 1 / ((F_M - F'_M / F'_M) + 1 + (Q_P \times F'_O / F_S) \times (F_M / F_O - 1)) \quad (\text{Kramer } et al., 2004)$$

représente la dissipation d'énergie par les centre réactionnels fermés (non-fonctionnels) ou endommagés.

La dissipation d'énergie sous forme non-photochimique régulée,  $Y(NPQ)$  :

$$- Y(NPQ) = 1 - Y(II) - Y(NO) \quad (\text{Kramer } et al., 2004)$$

représente la dissipation d'énergie par voie non-photochimique régulée du PSII. Ces mécanismes impliquent les rôles du cycle des xanthophylles et de la protéine PsbS.

Selon le modèle de Kramer *et al.* (2004), la dissipation d'énergie du PSII a été évaluée comme la somme de  $Y(II) + Y(NQP) + Y(NO) = 1$ .

### 3. LE PHOTOSYSTEME I

Le photosystème I (PSI) présente des similarités structurelles proches de celles du PSII. Le PSI est associé au PSII via le système de transport d'électrons. Le PSI est un complexe protéine pigment (19 sous-unités protéiques, 175 molécule de Chl) qui comporte deux phyloquinones et trois groupements  $Fe_4S_4$  (Ben-Shem *et al.*, 2003). Comme pour le PSII, le PSI est formé de deux grandes unités fonctionnelles que sont le complexe antennaire et le centre réactionnel.

#### 3.1. Les antennes collectrices de lumière du photosystème I

Le complexe antennaire du PSI (LHCI) est divisé en deux sous-unités, l'antenne interne et l'antenne périphérique. L'antenne interne consiste en une centaine de molécules de Chl *a* et en une vingtaine de  $\beta$ -carotènes, liées majoritairement au centre réactionnel par les sous-unités protéiques PsaA et PsbB (Jordan *et al.*, 2001). L'antenne périphérique contient environ

75 molécules de Chl *a* et quelques molécules de caroténoïdes, comme la lutéine et la violaxanthine (Schmid *et al.*, 2002). À la différence du LHCII, le LHCI contient très peu de Chl *b* et également un type de Chl particulier, appelé « Chl rouge » qui absorbe préférentiellement la lumière au-delà de 700 nm. La nature de ces Chl spéciales restent encore non résolue, mais la forme spectrale de ces chlorophylles se retrouvent dans la plupart des organismes photosynthétiques (Gobets *et al.*, 2001, Karapetyan *et al.*, 2006).

### 3.2. Le centre réactionnel du photosystème I

Le centre réactionnel du PSI est un monomère composé de 17 sous-unités protéiques (PsaA à PsaN) dont le rôle est connu et 2 sous-unités protéiques aux fonctions inconnues (PsaO et PsaP), voir Figure 1.15 (Knoetzel *et al.*, 2002; Ben-Shem *et al.*, 2003; Khrouchtchova *et al.*, 2005). Les sous-unités PsaA, PsaB et PsaC participent à la séparation de charge au niveau de PSI. Ces trois sous-unités permettent la liaison des cofacteurs essentiels à la séparation de charge : le P700 (un dimère de Chl *a*),  $A_0$  (une molécule de Chl *a*),  $A_1$  (une phylloquinone). De plus, le centre réactionnel du PSI est associé à trois complexes protéiques fer-soufre ( $Fe_4S_4$ ) :  $F_X$ ,  $F_A$  et  $F_B$ .

### 3.3. Absorption et transfert de l'énergie lumineuse du photosystème I

Les antennes collectrices de lumière permettant le transfert d'énergie au centre réactionnel du PSI par la présence des molécules de chlorophylle. Cependant, les  $^1Chl^*$  du LHCI possède deux façons de dissiper leur énergie d'excitation :

- Par transfert d'énergie à une autre molécule de Chl.
- Par dissipation sous forme de chaleur.

Lorsque l'énergie d'excitation parvient au centre réactionnel du PSI, le P700 induit une séparation de charge et un transport d'électrons vers le premier accepteur d'électron  $A_0$ . L'électron est transféré au second accepteur  $A_1$ , puis l'électron est transféré aux ferredoxine (Fdx) via trois accepteurs  $Fe_4S_4$  :  $F_X$ ,  $F_A$  et  $F_B$ . La Fdx est oxydée dans une réaction enzymatique catalysée par la ferredoxine NADP-réductase (ferredoxine : NADP<sup>+</sup> oxydoréductase; FNR). Dans cette réaction, le NADP<sup>+</sup> provenant du *stroma* sera réduit en NADPH (Chitnis, 2001). Le modèle concernant les aspects fonctionnels et structuraux est présenté sur la figure 1.15 selon Malkin et Niyogi (2000). Les réactions photochimiques et le

transport d'électrons sont caractérisés par une grande efficacité, avec un rendement quantique de 1 dans les conditions où la photochimie n'est pas limitée (Hiyama, 1985). Pour cette raison, la fluorescence variable n'apparaît pas comme une forme importante de dissipation d'énergie comparativement au PSII (Dau, 1994).

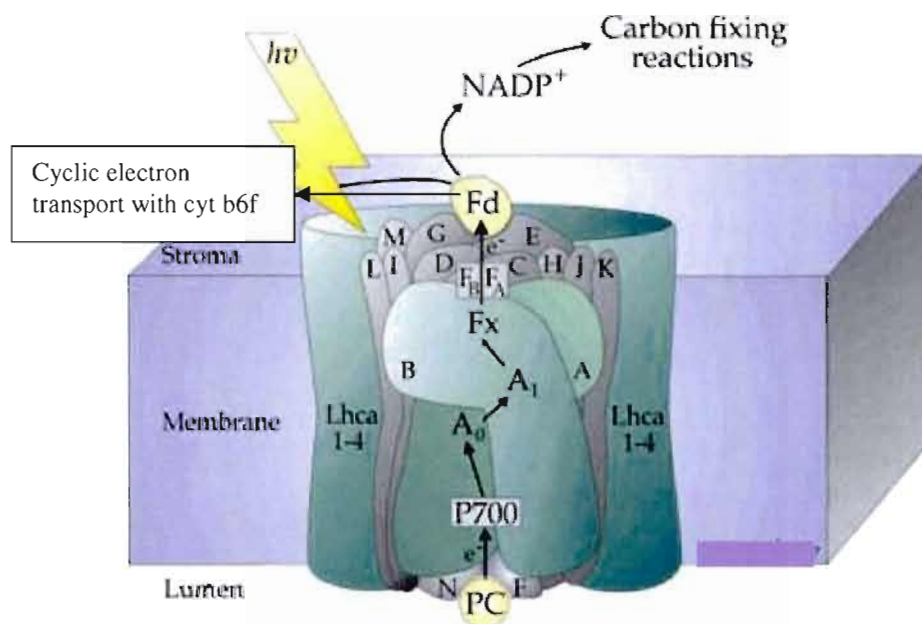


Figure 1.15: Schéma du transport d'électrons via le PSI. Les transporteurs d'électrons associés au PSI sont les PC, P700, A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, F<sub>x</sub>, F<sub>A</sub>, F<sub>B</sub> et Fd. Les sous-unités protéiques constituant le centre réactionnel du PSI sont indiquées par les lettres L, I, M, G, D, C, E, H, J et K (d'après Malkin et Niyogi, 2000 ; Jansen *et al.*, 2007).

### 3.4. Mesure de l'activité du P700

La fluorescence ne peut donc pas être utilisée pour mesurer l'activité du PSI, puisque l'oxydation du P700 en P700<sup>+</sup> par la séparation de charge n'entraîne pas de changement de fluorescence au niveau des LHCI. Cependant, l'oxydation du P700 induit un changement d'absorbance qui peut être utilisé comme indicateur de la photochimie du PSI. La figure 1.16 montre le spectre de différence entre les formes réduite et oxydée du P700. Le maximum du changement d'absorption du P700 se trouve à 700 nm, cependant, à cause de la grande absorbance des chlorophylles dans cette région, le changement d'absorption est mesuré à 830 nm pour évaluer l'activité du PSI.

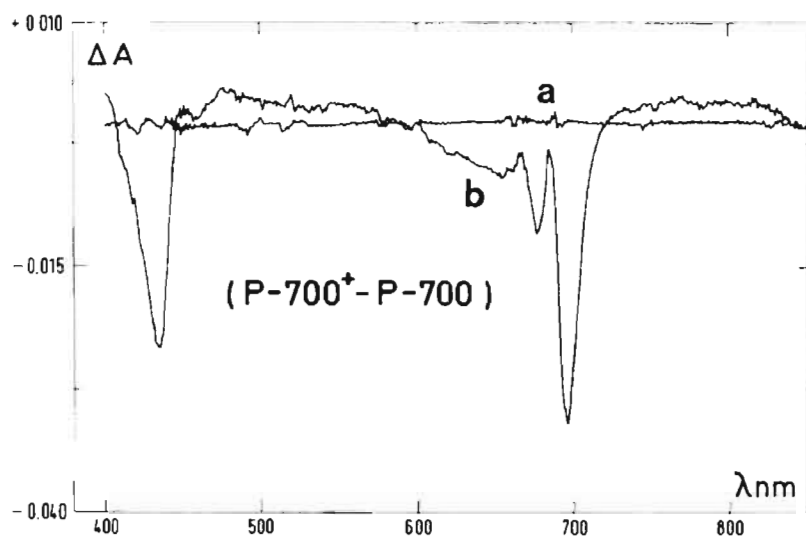


Figure 1.16: Spectre de différence entre l'absorption de la forme oxydée et réduite du P700. Les lettres a et b indiquent la ligne de base et le spectre de différence entre P700<sup>+</sup> et P700, respectivement (d'après Mathis *et al.*, 1988).

L'activité photochimique du PSI est évaluée par la méthode de Klughammer et Schreiber (1994). Les changements d'absorption à 830 nm utilisés pour évaluer l'oxydo-réduction photochimique du PSI sont présentés à la figure 1.17.

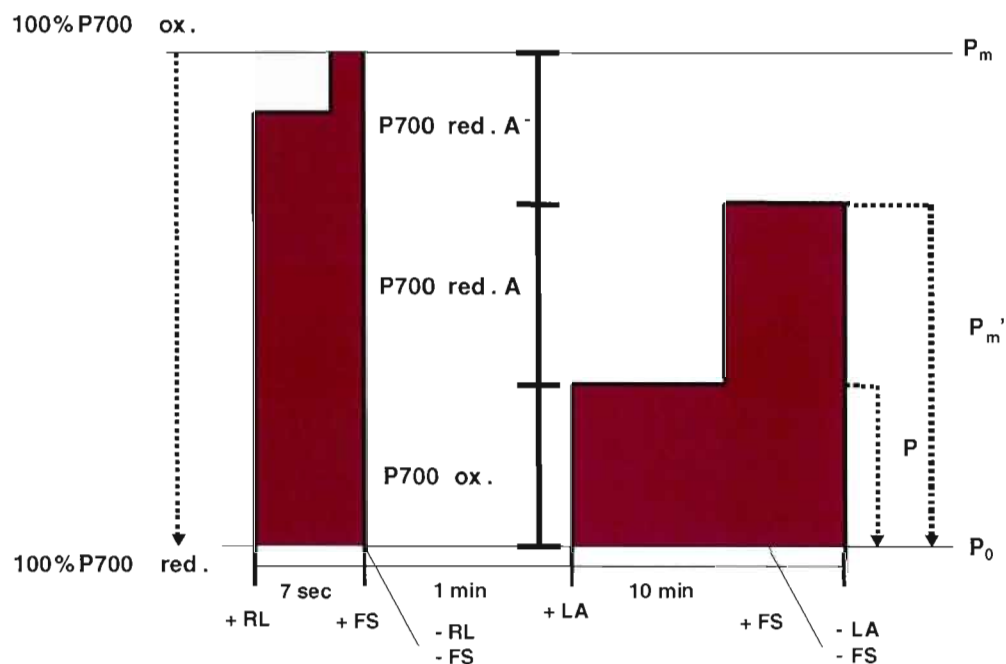


Figure 1.17: Détermination de la photochimie et de la dissipation d'énergie du PSI par mesure du changement d'absorption à 830 nm : L'oxydation du P700 est caractérisée par un changement positif d'absorbance. 100% P700 red. : P700 à l'état réduit après adaptation à l'obscurité ; 100% P700 ox. : P700 à l'état oxydé quand la plante est exposée au flash saturant en présence d'illumination rouge lointain (735 nm); P700 ox.: portion des centres réactionnels à l'état oxydé; P700red.A et P700 red.A' : centres réactionnels P700 qui peuvent et ne peuvent pas être réduits, respectivement, quand la plante est exposée à un flash saturant en présence de lumière actinique.  $P_0$  : niveau d'absorption lorsque les P700 sont réduits (100% P700 red.) ;  $P_m$  : niveau d'absorption lorsque les P700 sont oxydés (100% P700 ox.) ;  $P$  : niveau d'absorption induit par une illumination actinique ;  $P_m'$  : niveau d'absorption induit par un flash saturant en présence de lumière actinique ; FS : flash saturant ; RL ; illumination rouge lointain (735 nm) ; LA : illumination actinique (d'après Klughammer et Schreiber, 2008).

Les centres réactionnels du PSI sont dans un état maximal réduit ( $P_0$ ) après une adaptation à l'obscurité. Quand la plante est exposée à la lumière saturante lors d'une exposition à la lumière rouge lointain, une majorité des centres réactionnels du PSI sont dans leur état oxydé ( $P_m'$ ). La plante est ensuite exposée à la lumière continue (actinique), après une adaptation à l'obscurité et une partie des P700 va être dans un état oxydé ( $P$ ). L'application d'un flash

saturant lors de l'illumination actinique, les P700 vont être oxydés ( $P_m'$ ) sans arriver au maximum d'oxydation.

Le rendement photochimique maximal du PSI, chez une plante adaptée à l'obscurité, est évalué par l'application d'un flash saturant qui va induire une oxydation maximale du P700, indiqué par :

$$\Phi_M I = P_m' - P_0 \quad (\text{Klughammer et Schreiber, 1994})$$

$P_m'$  représente le niveau d'absorption de l'état maximal de P700<sup>+</sup>, induit par un flash saturant.

$P_0$  représente l'absorption du P700 à l'état maximum réduit, induit par une adaptation à l'obscurité.

Quand la plante est exposée à la lumière continue, la dissipation d'énergie via le PSI peut être aussi évaluée par le changement d'absorption du P700. La dissipation d'énergie via le PSI est répartie dans trois catégories : 1. Dissipation d'énergie par voie photochimique ; 2. Dissipation d'énergie non-photochimique déterminée par une limitation du côté donneur du PSI ; 3. Dissipation d'énergie par la voie non-photochimique déterminée par une limitation du côté accepteur du PSI.

La dissipation d'énergie par voie photochimique :

$$Y(I) = P_m' - P / P_m - P_0 \quad (\text{Klughammer et Schreiber, 2008})$$

qui représente la portion des PSI à l'état P700 –  $A_0$ , où le P700 est à l'état réduit et  $A_0$ , le premier accepteur d'électron, est à l'état oxydé. Dans cette équation,  $P$  est le niveau d'absorbance de P700 sous illumination continue.

La dissipation d'énergie par voie non-photochimique due à une limitation du côté donneur est estimée par :

$$Y(ND) = P - P_0 / P_m - P_0 \quad (\text{Klughammer et Schreiber, 2008})$$

qui représente la portion des P700 à l'état oxydé (P700<sup>+</sup>), donc incapable de séparation de charge, sous une illumination continue. La réduction du P700 se fait par le passage des électrons du PSII vers le PSI, une limitation du côté donneur du PSI indique donc une diminution de transport d'électrons entre les deux photosystèmes.

La dissipation d'énergie par voie non-photochimique due à une limitation du côté accepteur est estimée par :

$$Y(NA) = P_m - P_m' / P_m - P_0 \quad (\text{Klughammer et Schreiber, 2008})$$

qui représente la fraction des P700 à l'état  $P700 - A_0^-$ , soit que le P700 est réduit mais incapable de donner un électron car l'accepteur primaire  $A_0$  est réduit. Dans cette équation,  $P_m$  est le niveau d'absorbance de l'oxydation maximale du P700, lorsqu'un flash saturant est appliqué après une illumination dans le rouge lointain (assurant une excitation préférentielle du P700). La limitation du côté accepteur du P700 est observée lorsque les électrons du PSI ne sont pas transférés au  $NADP^+$ , soit par une diminution de l'activité du Cycle de Calvin ou de la FNR. En absence d'accepteur d'électron, aucune oxydation du P700 ne peut se produire (Rutherford et Heathcote, 1985 ; Golbeck, 1987).

La distribution d'énergie au niveau du PSI dans une plante adaptée à la lumière (sous illumination continue) est estimé par la somme de la dissipation photochimique du PSI ( $Y(I)$ ) et de la dissipation non-photochimique causée par une limitation du côté accepteur ( $Y(NA)$ ) ou du côté donneur ( $Y(ND)$ ) du PSI comme

$$Y(I) + Y(NA) + Y(ND) = 1 \quad (\text{Klughammer et Schreiber, 2008})$$

#### 4. DISTRIBUTION DE L'ENERGIE ENTRE LES DEUX PHOTOSYSTEMES

Le PSII et le PSI ont des spectres différents d'absorption de l'énergie lumineuse et absorbent préférentiellement la lumière à des longueurs d'ondes spécifiques, soit 680 nm et 700 nm pour les PSII et PSI, respectivement (Malkin et Niyogi, 2000). Comme la plante n'est pas toujours exposée au même spectre et intensité de lumière, la proportion de l'énergie lumineuse absorbée par les PSII et PSI peut aussi varier. Pour s'adapter à ce changement de conditions écologiques, les PSII et PSI passent par des changements structurels et fonctionnels appelés états de transition.

Le processus des états de transitions permet d'ajuster à court terme la quantité de lumière absorbée par les PSII et PSI (Bellafiore *et al.*, 2005 ; Kanervo *et al.*, 2005). Le changement de l'état de transition I à l'état II est caractérisé par une diminution de la taille des antennes

LHCII du PSII par rapport au PSI. La régulation de la taille des antennes collectrices de lumière se fait par la phosphorylation réversible des polypeptides Lhcb1 et Lhcb2 des antennes LHCII contrôlée par l'état d'oxydo-réduction des PQ, voir figure 1.18 (Wollman, 2001). Lorsque la capacité de transport d'électrons via le PSII est plus forte que celle du PSI, une accumulation de PQ réduite ( $PQH_2$ ) va activer une kinase responsable pour la phosphorylation du LHCII. La phosphorylation du LHCII déclenche son détachement du PSII et induit une migration vers le PSI. Sous ces conditions, le PSI augmente sa surface d'absorption de la lumière et conséquemment son transport d'électrons. La réaction inverse se produit lorsque le transport d'électron du PSI est plus élevé que celui du PSII, induisant une accumulation de PQ oxydée.

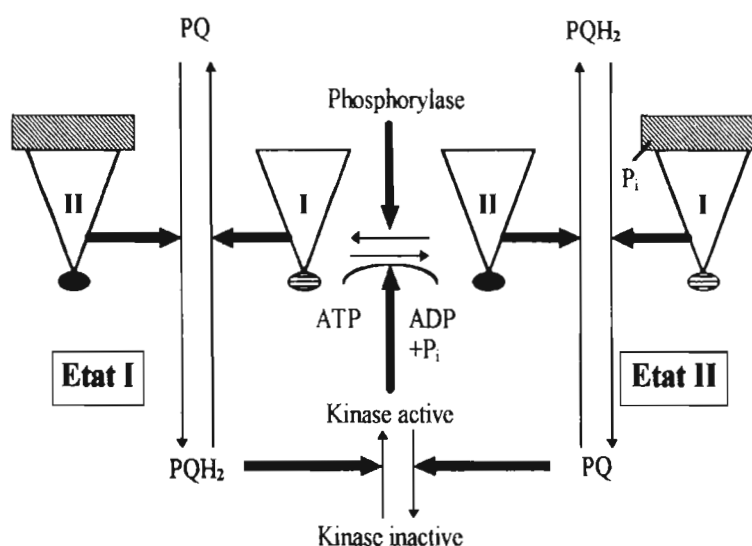


Figure 1.18: Schéma de la régulation des changements d'état I et II par l'induction de la phosphorylation des LHCII (d'après Jupin et Lamant, 1999). Les rectangles achurés indiquent la proportion des LHCII mobiles.

Lorsque le débalancement entre les capacités de transport d'électrons des PSII et PSI est de longue durée, ou que les états de transition ne peuvent réajuster l'équilibre entre les deux photosystèmes, un changement dans la stoechiométrie entre le PSII et le PSI peut être observé. Ce changement dans le nombre de PSII par rapport au nombre de PSI peut s'effectuer dans le cas d'altération dans le spectre de lumière (Murakami *et al.*, 1997) ou dans les besoins énergétiques de l'organisme (Kovacs *et al.*, 2000). L'ajustement de la



stoichiometrie peut se faire par l'ajustement du nombre de PSII ou du nombre de PSI (Fujita, 1997 ; Kovacs *et al.*, 2000). Ce changement dans le ratio entre les deux photosystèmes permet de conserver un rendement photochimique optimal sous toutes conditions (Melis *et al.*, 1996).

## 5. LES RÉACTIONS BIOCHIMIQUES DE LA PHOTOSYNTHÈSE

La phase sombre de la photosynthèse est établie uniquement sur les réactions biochimiques et est indépendante de la lumière. C'est un ensemble de réactions qui permettent la production de glucide, par la fixation du dioxyde de carbone en utilisant l'ATP et le NADPH produit lors de la phase claire. La phase sombre a lieu dans le stroma du chloroplaste où le CO<sub>2</sub> est fixé et utilisé dans le Cycle de Calvin. Ce Cycle se déroule globalement en trois étapes (Figure 1.19):

- Le CO<sub>2</sub> est fixé pendant la carboxylation du ribulose 1,5-biphosphate (RuBP) via la ribulose-1,5-biphosphate carboxylase (Rubisco), en produisant 3 phosphoglycérates (PGA).
- Le PGA est réduit en triose phosphate (3-phosphoglyceraldéhyde) qui sera transféré dans le cytosol et utilisé pour la formation de sucrose.
- La RuBP, sera régénérée pour un nouveau cycle (Raines, 2003).

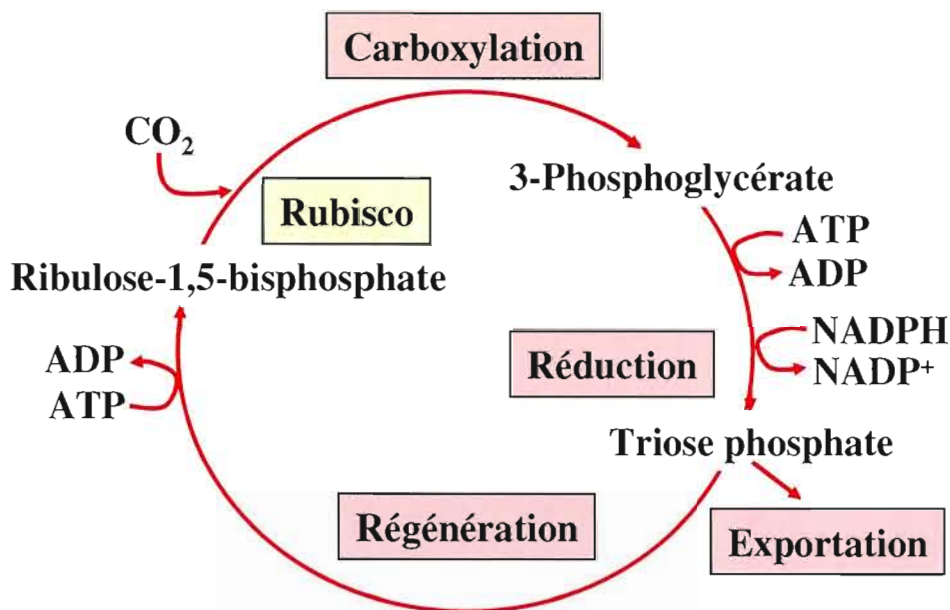


Figure 1.19: Schéma représentant les réactions biochimiques de la fixation du  $\text{CO}_2$  pendant les différentes étapes du cycle de Calvin (d'après Campbell, 1995).

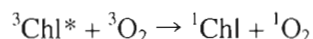
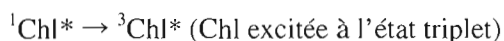
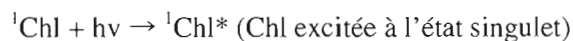
## 6. LES ESPECES RÉACTIVES DE L'OXYGÈNE (ERO) INDUIT PAR LE TRANSPORT D'ÉLECTRONS PHOTOSYNTHÉTIQUE

À son état stable, la molécule d'oxygène est paramagnétique, c'est-à-dire qu'elle possède deux électrons de spin parallèle sur sa couche électronique externe. Cette propriété rend l' $\text{O}_2$  non réactif avec les molécules organiques ayant des électrons de spin opposé. Cependant, les radicaux libres qui proviennent de l'oxygène possèdent une grande réactivité envers les molécules biologiques du fait de la présence d'un électron non apparié dans leur couche externe (McKersie et Leschem, 1994). Les ERO les mieux connus sont l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) et le radical hydroxyl ( $\text{OH}$ ). Bien qu'il ait été montré que les ERO peuvent jouer un rôle important dans la signalisation cellulaire, il n'en demeure pas moins qu'ils sont nocifs pour l'organisme. En effet, les ERO s'attaquent aux macromolécules biologiques telles les protéines, les lipides et les acides nucléiques (Halliwell et Gutteridge, 1999). Les organismes disposent d'un système de défense pour éliminer le surplus d'ERO. Le stress oxydatif aura lieu lorsque les antioxydants ne sont plus en mesure de limiter les effets d'une trop grande concentration d'ERO.

Le changement d'états d'oxydation de l'oxygène se produit selon deux mécanismes :

- L'absorption d'énergie menant à l'état singulet en changeant le spin d'un électron libre.
- Lors de la réduction monovalente de l'oxygène.

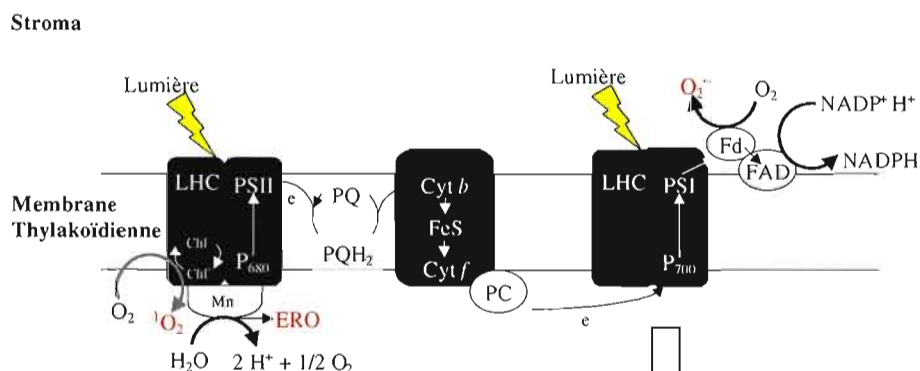
Lorsque l'énergie absorbée par les LHCI excède la capacité de dissipation d'énergie par la photochimie, la chaleur et les autres processus de dissipation, la chlorophylle excitée  $^1\text{Chl}^*$  passe à l'état triplet ( $^3\text{Chl}^*$ ), qui peut transmettre l'énergie à l'oxygène pour former l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) selon les étapes suivantes :



Donc, les antennes collectrices de lumière du PSII peuvent représenter, sous certaines conditions, une source importante de la formation des ERO (Figure 1.20 ; Nishiyama *et al.*, 2006). La production d'oxygène singulet par le PSII se fait habituellement sous de hautes intensités lumineuses, lors d'une inhibition du transport d'électrons par différents polluants ou lors de stress thermique causé par les basses températures (Niyogi, 1999).

Le PSI peut également entraîner la production d'ERO. Il est connu que la réduction de l'oxygène en ion superoxyde peut être induite par la ferrédoxine NADP<sup>+</sup> réductase (FNR) au niveau du PSI (Asada, 1994). Cette voie devient importante lorsque le cycle de Calvin est inhibé par les xénobiotiques. Dans ces conditions, peu de NADP<sup>+</sup> est disponible et le PSI accumule des électrons qui vont induire la formation de l'ion superoxyde (Figure 1.20).

A



Lumen

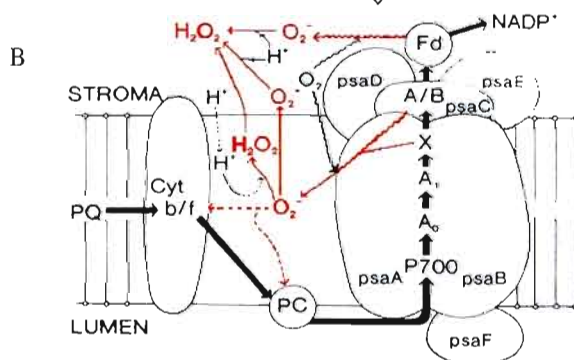


Figure 1.20: Sites de formation d'ERO pendant la photosynthèse. (A) Pendant le transport des électrons entre le PSII et PSI. (B) Détails de la formation des ERO pendant le transport d'électrons au niveau du PSI. Les flèches noires représentent le transport d'électrons photosynthétique et les flèches rouges représentent la formation d'ERO (d'après Asada, 1994; McKersie et Leshem, 1994). Pour les abréviations voir dans le chapitre.

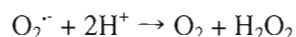
L'anion superoxyde ( $O_2^-$ )

Cet ERO est produit lorsque l'oxygène moléculaire à l'état triplet accepte un électron. L'anion superoxyde peut alors réagir avec des molécules organiques tel le NADPH ou certaines enzymes, ce qui a pour effet potentiel de les inhiber (Kono et Fridovich, 1982; Lledias *et al.*, 1998). L'anion superoxyde est capable de diffuser librement à travers les différents compartiments du système cellulaire.

Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )

Cet ERO non-radicalaire est un produit de la superoxyde dismutase (SOD), une enzyme antioxydante. Cette molécule est moins réactive et peut diffuser à travers les membranes lipidiques et réagir loin de son site de production. C'est la forme la plus stable et la moins dommageable pour l'organisme comparativement aux autres ERO.

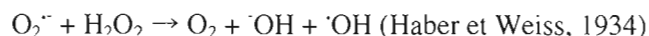
Comme son nom l'indique, cette enzyme catalyse la réaction de dismutation de l'anion superoxyde et les produits de la réaction enzymatique sont l' $O_2$  et  $H_2O_2$  selon la réaction :



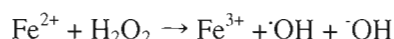
Il y a plusieurs types de SOD qui diffèrent majoritairement selon la composition du cofacteur métallique. Paradoxalement, ce dernier peut être formé d'ions métalliques de cuivre, de zinc, de manganèse ou de fer, lesquels sont également impliqués dans la formation d'ERO (Van Camp *et al.*, 1994; Bowler *et al.*, 1994). Cette enzyme est présente dans presque tous les compartiments cellulaires.

Le radical hydroxyl ( $\cdot OH$ )

Le radical hydroxyl est produit durant la réaction d'Haber-Weiss. Celle-ci implique l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène ainsi qu'un cation de transition tel que le  $Cu^{2+}$  ou le  $Fe^{3+}$  selon la réaction :



ou à partir du peroxyde d'hydrogène impliquant un métal de transition comme le  $Fe^{2+}$  ou le  $Cr^{6+}$  selon la réaction de Fenton:



Ce radical hydroxyl est le plus toxique et affecte toutes les macromolécules cellulaires (Foyer *et al.*, 1997).

## 7. EFFETS DES MÉTAUX SUR LA PHOTOSYNTHÈSE

Les activités humaines liées aux secteurs minier et industriel contribuent à la contamination des écosystèmes par les métaux. Certains de ces éléments, comme le cuivre ( $Cu^{2+}$ ), le fer

( $\text{Fe}^{2+}$ ), le zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ), le magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ), le manganèse ( $\text{Mn}^{2+}$ ) et le nickel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) sont essentiels pour l'activité de plusieurs enzymes comme cofacteurs. Cependant, des métaux comme l'aluminium ( $\text{Al}^{3+}$ ), le chrome VI, le cadmium ( $\text{Cd}^{2+}$ ), le mercure ( $\text{Hg}^{2+}$ ) et le plomb ( $\text{Pb}^{2+}$ ) ne sont pas essentiels au métabolisme cellulaire (Raven *et al.*, 1999). Certains éléments peuvent être très toxiques pour les organismes vivants (Walker *et al.*, 1996). Il a été rapporté que la toxicité des métaux affecte plusieurs processus liés à la photosynthèse (Bertrand et Poirier, 2005). Comme la photosynthèse représente le principal producteur de matière organique dont dépend l'ensemble des écosystèmes terrestre et aquatique, un dysfonctionnement des processus photosynthétiques induit par la toxicité des métaux peut avoir un impact néfaste pour la biosphère.

Les ions métalliques entrent dans la cellule végétale passivement, par diffusion, ou activement par les canaux de transport utilisés pour d'autres éléments comme le  $\text{Ca}^{2+}$ , le  $\text{Fe}^{2+}$  ou le  $\text{Mg}^{2+}$  (Williams *et al.*, 2000 ; Mendoza-Cozatl et Moreno-Sanchez, 2005). Dans le passé, il a été rapporté que 60 % de certains métaux accumulés dans la cellule végétale peut être localisés spécifiquement dans les chloroplastes et conséquemment peut affecter directement les processus photosynthétiques (Nagel *et al.*, 1996 ; Mendoza-Cozatl et Moreno-Sanchez, 2005). Dans le chloroplaste, les métaux peuvent agir sur les processus liés à la photosynthèse de plusieurs façons :

- Par la liaison aux groupements S-H des protéines causant leur altération.
- En substituant des cofacteurs essentiels à certaines molécules ou enzymes.
- Par la production d'ERO dans le transport d'électrons.

Ces effets peuvent mener à une altération des propriétés structurales et fonctionnelles des photosystèmes.

Les métaux peuvent avoir une action néfaste sur la biosynthèse des pigments chlorophylliens à partir de protochlorophyllide, en inhibant la catalyse enzymatique de cette réaction. En effet, les métaux comme le chrome VI et le  $\text{Cd}^{2+}$  sont réputés pour inhiber la NADPH-protochlorophyllide oxydoreductase (POR) qui est l'enzyme responsable de cette transformation (Mysliwa-Kurdiel et Strzalka, 2005). Le  $\text{Cu}^{2+}$  inhibe lui aussi la biosynthèse de chlorophylle, mais il retarde également son intégration aux photosystèmes (Caspi *et al.*,

1999). Cette inhibition de la synthèse de chlorophylle va se répercuter au niveau de la taille des complexes antennaires du PSII et du PSI, en réduisant la capacité d'absorber la lumière et donc d'effectuer la photosynthèse de manière optimale.

De nombreux métaux lourds peuvent favoriser la formation d'ERO (Figure 1.23). Le chrome VI, par exemple, entraîne la formation de ERO qui induit une altération de la chlorophylle dans les chloroplastes de *Chlamydomonas reinhardtii* (Rodriguez *et al.*, 2007). La molécule de *chl* porte un atome de Mg qui peut être remplacé par un atome métallique comme le  $\text{Cd}^{2+}$ , le  $\text{Cu}^{2+}$ , l' $\text{Hg}^{2+}$ , le  $\text{Ni}^{2+}$ , le  $\text{Pb}^{2+}$  ou le  $\text{Zn}^{2+}$  (Küpper *et al.*, 1998). Il en résulte conséquemment un changement de la chl qui diminue sa capacité transférer l'énergie captée du complexe antennaire vers le centre réactionnel. De plus, cela peut modifier le spectre d'absorption de la lumière par l'appareil photosynthétique.

Les effets des métaux peuvent affecter la composition en pigment en entraînant des changements dans le ratio chl *a*/chl *b* (Clijsters et Van Assche, 1985 ; Appenroth *et al.*, 2003 ; Aravind et Prasad, 2004). Le changement de ce ratio peut être attribué à un changement de la taille des antennes périphériques du PSII (contenant en majorité de la Chl *b*) par rapport aux centres réactionnels (contenant uniquement de la Chl *a*). Lors d'une affectation par les métaux, on peut observer une augmentation de quantité de caroténoïdes qui agissent comme pigments photoprotecteurs en réponse au stress induit (Kobayashi *et al.*, 1997 ; Rodriguez *et al.*, 2007). Les xanthophylles, les pigments du groupe des caroténoïdes liés à la régulation de la dissipation d'énergie sous forme de chaleur, sont aussi sensibles aux effets des métaux. Par exemple, quand *Jungermannia exsertifolia cordifolia* a été exposé au  $\text{Cd}^{2+}$ , on a noté que le ratio de zéaxanthine par rapport à la violaxanthine et l'antheraxanthine a été augmenté comme conséquence du changement des voies de dissipation d'énergie (Otero *et al.*, 2006).

Les métaux peuvent induire une altération de la photochimie des photosystèmes II et I causant une diminution du taux de transport d'électrons photosynthétiques et de la production d'ATP et de NADPH. Le PSII est généralement considéré comme la cible la plus sensible à l'action toxique des métaux (Samson et Popovic, 1988; Juneau *et al.*, 2001 ; Dewez *et al.*,

2005). Certaines études rapportent que les métaux  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$ , affectent le PSII au niveau du CDO en inhibant l'activité catalytique du système enzymatique de photolyse de l'eau (Samson et Popovic, 1990). Le  $\text{Cd}^{2+}$  entraîne la substitution de cofacteurs, comme le  $\text{Ca}^{2+}$ , essentiels pour l'enzyme participant à la photolyse de l'eau (Faller *et al.*, 2005). Les effets des métaux, tel le chrome VI et le  $\text{Ni}^{2+}$ , sur le CDO peuvent également s'effectuer via l'altération des sous-unités protéiques qui composent le CDO (Ait Ali *et al.*, 2006 ; Boisvert *et al.*, 2007). Le côté accepteur du PSII peut aussi être une cible sensible pour l'inhibition par les métaux. Par exemple, le  $\text{Cd}^{2+}$  peut se lier à la  $\text{Q}_\text{B}$ , le second accepteur d'électrons du PSII, et induire une inhibition du transfert d'électrons vers le PSI (Sigfridsson *et al.*, 2004). Des effets similaires ont été rapportés pour le  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  et  $\text{Pb}^{2+}$  (Boucher et Carpentier, 1999).

L'inhibition des donneurs ou accepteurs d'électrons du PSII limite sa capacité photochimique et ainsi augmente sa sensibilité à la photoinhibition (Pätsikkä *et al.*, 1998 ; Pagliano *et al.*, 2006 ; Takahashi et Murata, 2008). Les métaux peuvent entraîner la dégradation de la protéine-structurelle D1 du PSII et, causer ainsi une importante diminution du nombre de centre réactionnel actif (Atal *et al.*, 1991 ; Ait Ali *et al.*, 2006). Cette photoinhibition induira, lors d'une illumination prolongée la formation d'ERO et ainsi la détérioration des protéines et des lipides constituant les thylacoïdes (Pätsikkä *et al.*, 2001).

En général, on considère le PSI moins sensible à l'effet des métaux, nécessitant une concentration plus importante que celle qui affecte le PSII (Tripathy *et al.*, 1981, 1983 ; Boucher et Carpentier, 1999 ; Zhou *et al.*, 2006). Cependant, dans certains cas, une diminution de l'activité photochimique a été observée, par exemple, l'aluminium peut induire une inactivation des PSII et PSI chez les cyanobactéries et les algues vertes (Atal *et al.*, 1991 ; Rai *et al.*, 1996, 1998). Les sites d'inhibition des métaux sur le PSI restent indéterminés, il est pourtant suggéré que cette inhibition est associée à un blocage des électrons du côté accepteurs du PSI (Hörcsik *et al.*, 2007).

Les métaux peuvent avoir un impact néfaste sur les réactions de la phase sombre, en inhibant l'activité de la Rubisco, le cycle de Calvin est affecté et empêche la fixation du  $\text{CO}_2$  pour la synthèse de glucide (Krupa *et al.*, 1993 ; Monnet *et al.*, 2001). La liaison du  $\text{Cd}^{2+}$  aux



enzymes qui participent dans les processus de concentration du carbone dans le *stroma* peut aussi inhiber la fixation du  $\text{CO}_2$  (Sas *et al.*, 2006). Il a été rapporté que la formation de sucre peut être sévèrement inhibée quand *Spirodela polyrhiza* est exposé aux effets du chrome VI (Appenroth *et al.*, 2003). L'inhibition du cycle de Calvin peut se répercuter sur l'activité photochimique du PSII. En effet, cela entraîne une accumulation de l'ATP et du NADPH qui sera inutilisés, par conséquent, l'activité photochimique s'en retrouvera diminuée causant ainsi la photoinhibition du PSII (Subrahmanyam et Rathore, 2000).

Une photoinhibition des PSII ou PSI va entraîner des changements au niveau des mécanismes de dissipation d'énergie. Par exemple, lorsque l'on expose des thylacoïdes au  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  ou  $\text{Pb}^{2+}$ , il en résulte l'augmentation de la dissipation d'énergie sous forme de chaleur perçue, d'autre part, par le « quenching » de la dissipation d'énergie sous forme de fluorescence (Boucher et Carpentier, 1999). Une exposition au  $\text{Cu}^{2+}$  des algues *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornatum* et *Chlamydomonas reinhardtii* a induit une diminution de la dissipation d'énergie sous forme photochimique ( $Q_P$ ) et une augmentation de la dissipation d'énergie sous forme non-photochimique ( $Q_N$ ) (Juneau *et al.*, 2002). Cependant, le Hg entraîna chez l'algue *S. capricornatum* une augmentation de  $Q_N$  sans affecter  $Q_P$  (Juneau et Popovic, 1999). Un effet similaire a été observé pour le cadmium, où des concentrations plus faibles que 1 mM n'entraînent pas de diminution de la capacité de transport d'électrons, mais augmente la dissipation d'énergie sous forme non-photochimique.

En altérant les voies de dissipation photochimique et non-photochimique, les métaux peuvent entraîner la formation massive d'ERO directement lié aux photosystèmes (Figure 1.21). La production de ERO par le chrome VI,  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$  a été rapportée chez différentes espèces d'algues et de plantes (Rai *et al.*, 2004 ; Ait Ali *et al.*, 2006 ; Knauert et Knauer, 2008 ; Kumar *et al.*, 2008). Les ERO ont un rôle important dans la toxicité induite par les métaux. Par exemple, chez les algues vertes *Pseudokirchneriella subcapitata* et *C. vulgaris*, l'inhibition de la photosynthèse par le  $\text{Cu}^{2+}$  est liée à la production d'ERO puisque l'ajout de N-tert-butyl- $\alpha$ -phenylnitrone, un antioxydant, rétablit complètement l'activité photosynthétique chez les algues exposées au  $\text{Cu}^{2+}$  (Knauert et Knauer, 2008). La résistance aux métaux peut être influencée par la capacité de produire des antioxydants en réponse aux

effets toxiques des métaux. Par exemple, une souche de *Scenedesmus acutus* résistante au  $\text{Ni}^{2+}$  possède une activité plus élevée des enzymes antioxydantes superoxyde dismutase, glucose-6-phosphate déshydrogénase et glutathione peroxydase par rapport à une souche sensible (Randhawa *et al.*, 2001). Lors de l'exposition d'*Ocimum tenuiflorum* au chrome VI, la production d'enzymes antioxydantes peut participer à la protection de la plante aux effets toxiques du chrome VI (Rai *et al.*, 2004). Dans la photosynthèse, certains pigments comme les caroténoïdes, la lutéine et la zéaxanthine ont un rôle antioxydant et protègent l'appareil photosynthétique du stress causé par la production d'ERO (Palozza et Krinsky, 1992 ; Niyogi *et al.*, 1997a ; Baroli *et al.*, 2003). La synthèse de ces antioxydants est stimulée quand la plante est exposée aux métaux (Otero *et al.*, 2006).

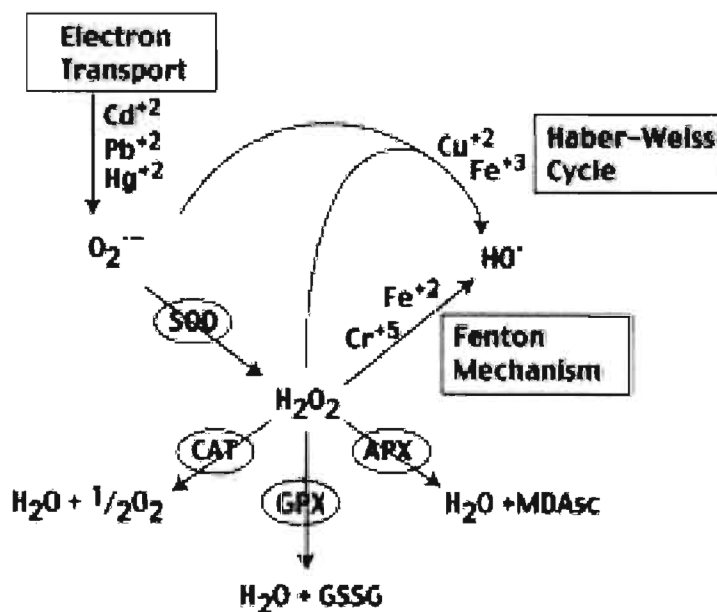


Figure 1.21: Formation et devenir des ERO induites par les métaux lourds et des réactions enzymatiques (d'après Pinto *et al.*, 2003). SOD: Superoxyde dismutase, CAT: Catalase, GPX: Glutathion peroxydase, APX: Ascorbate peroxydase, GSSG: glutathion oxydé, MDAsc: Monodehydroascorbate.

## 8. LES NANOPARTICULES METALLIQUES

Une nanoparticule se définit comme un assemblage de plusieurs milliers d'atomes qui forment un composé dont la taille varie de 1 à 100 nm (Zhao *et al.*, 2007). Il existe de nombreux types de nanoparticules (NP) d'origine naturelle (Emission volcanique, source hydrothermale, pollen), les NP issues de l'industrie, ou de la combustion de matière fossile, comme produit secondaire et les NP d'origine contrôlée issue du développement intensif des nanotechnologies (Navarro *et al.*, 2008a). Les nanotechnologies ou l'utilisation de matériaux nanométriques sont une activité très récente qui concerne de nombreux domaines (semi-conducteur, électronique, textile, industrie alimentaire, crème solaire, cosmétiques, peinture, etc) et une économie importante dont le budget global, en 2006, pour son développement est estimé à plus de 10,5 milliards de dollars (Handy *et al.*, 2008 ; Crane *et al.*, 2008). Cet engouement pour les nanotechnologies s'accompagne inévitablement de la question sur l'impact de tels composés sur l'environnement et la biosphère. La nanotoxicologie est donc basée sur l'étude de la toxicité des nanoparticules sur les êtres vivants. Un défi délicat puisque la seule vérité en ce qui a trait aux NP est leur échelle de l'ordre du nanomètre, qui se traduit par le fait que plus elles sont petites plus leur surface spécifique est importante et donc possiblement réactive (Figure 1.22).

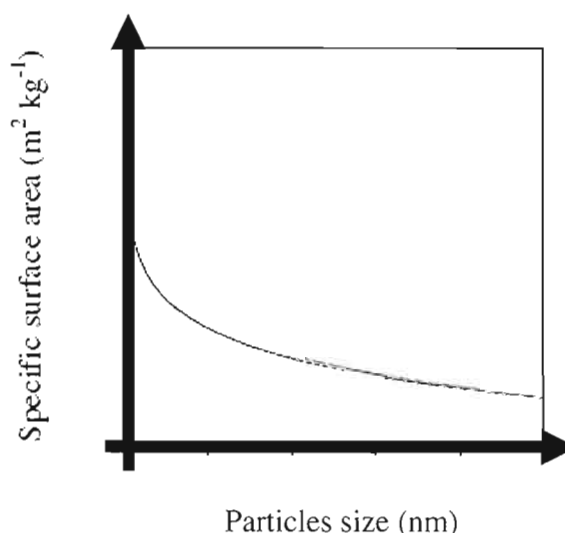


Figure 1.22: Relation entre l'aire spécifique de surface des particules sphériques ( $\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$ ) et leur taille (nm), exprimée par la même quantité et volume (d'après Navarro *et al.*, 2008a).

En dehors de cette relation, la composition des NP varie énormément, ce qui entraîne une multitude de possibilités quant à leurs interactions avec l'environnement sur le plan abiotique, biotique et conséquemment leur impact sur les organismes vivants (Figure 1.23.A). Étant une discipline très récente, il existe peu d'études sur la toxicité des NP dans l'environnement.

Les interactions des NP avec les composantes de l'environnement vont accroître ou non leur biodisponibilité pour les organismes vivants. Navarro (2008a) propose, dans son étude sur le comportement des NP et leur écotoxicité pour les algues, plantes et champignons, les possibles interactions des NP avec les composés environnementaux (Matière organique, Ions, Xenobiotiques) et leur résultante sur l'interaction avec les organismes vivants. Ainsi, nous pouvons constater que lorsque les NP interagissent avec la matière organique, la surface spécifique et la charge des NP peut changer. Ces interactions peuvent modifier les propriétés d'agrégation et de sédimentation des NP, et changer ainsi, leur biodisponibilité pour les organismes vivants. Il en va de même lorsque les NP réagissent avec certains xénobiotiques augmentant ainsi leur propre biodisponibilité. Par contre, lorsque les NP réagissent avec des ions augmente les interactions entre NP qui forment des agrégats et sédimentent par conséquent (Figure 1.23.B). Les mécanismes de pénétration dans la cellule sont encore controversés. Cependant Moore (2006) défend l'idée que les NP peuvent passer les membranes cellulaires par les mécanismes d'endocytose. Ce processus de formation d'une cavité autour d'une NP au niveau de la bicouche lipidique des cellules, appelé invagination, permettrait l'entrée des NP dans le cytoplasme cellulaire. D'autres mécanismes sont proposés pour favoriser l'entrée des NP dans la cellule, comme les transporteurs protéiques ou les canaux ioniques présents dans les membranes cellulaires. Ces mécanismes sont dépendants des caractéristiques physico-chimiques de la NP, une fois à l'intérieur, il est fortement présumé qu'elles interagiront avec le métabolisme cellulaire.

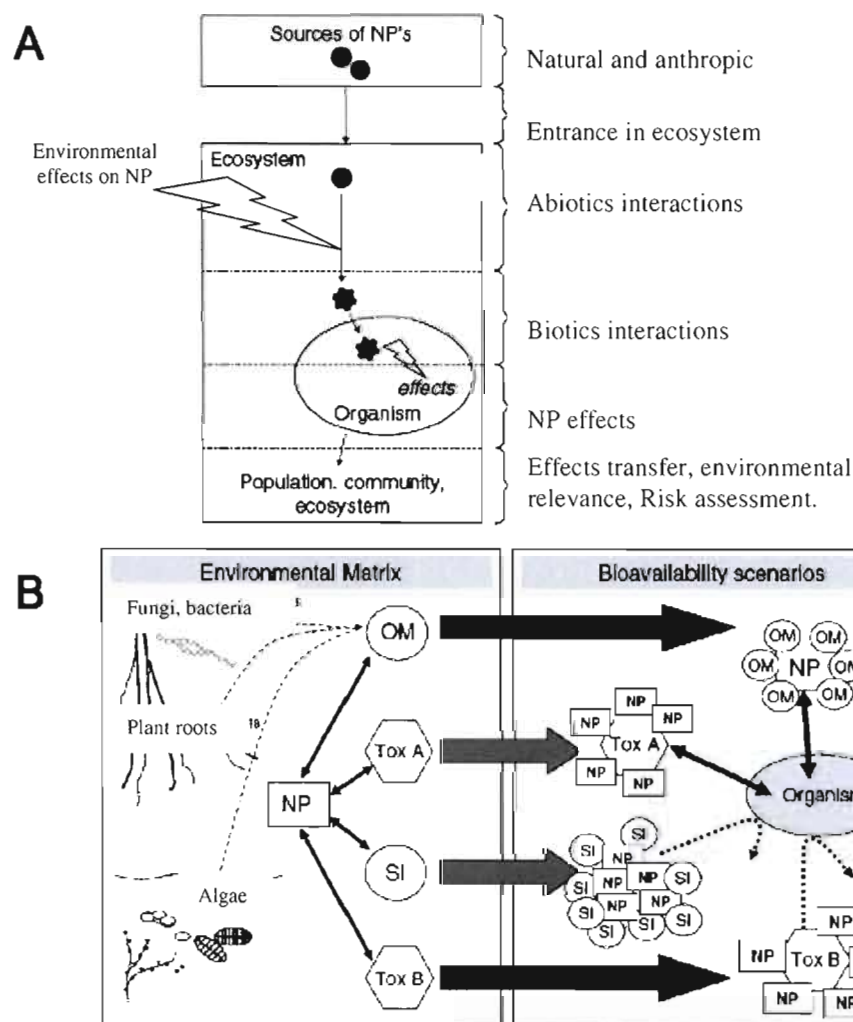


Figure 1.23: **A.** Représentation schématique de l'impact des NP depuis leur source jusqu'aux écosystèmes. Une fois produit, les NP pourront prendre différentes voies et se retrouver dans les écosystèmes. Ainsi, les NP pourront interagir avec le milieu abiotique car les conditions environnementales (air, eau, terre) conduiront à des altérations physico-chimiques des NP. Ces altérations seront déterminantes pour l'interaction des NP avec les facteurs biotiques (biodisponibilité pour les organismes) et, conséquemment pour les possibles effets sur les organismes qui pourront avoir un impact sur l'ensemble de l'écosystème. **B.** Schéma présentant les interactions entre les NP et des xenobiotiques (Tox A, Tox B), les ions (SI) ou la matière organique (OM) comme l'acide humique ou les rejets des bactéries, plantes, champignons et la conséquence sur la biodisponibilité pour les organismes vivants (d'après Navarro et *al.*, 2008a).

Nous nous intéresserons ici aux NP les plus couramment développées et utilisées dans diverses industries, donc les plus susceptibles de se retrouver dans l'environnement, notamment les milieux aquatiques. Dans ce contexte, les plus connues sont les fullerènes. Ces NP sont

composés de 20 à 100 atomes de carbone pouvant prendre des formes sphériques, tubiques (nanotubes) ou encore ellipsoïdale. Il a été démontré que ces fullèrenes peuvent causer des dommages en entraînant la formation importante de ERO dans le cerveau d'achigan à grande bouche juveniles, *Micropterus salmoides* (Oberdörster, 2004). Il a aussi été mis en évidence que les fullerenes pouvaient affecter la croissance d'une algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii* et être bioaccumulé pour finalement affecter son prédateur *Daphnia magna* (Luo, 2007).

Il existe un autre type de NP tout aussi inquiétant sur le plan environnemental, ce sont les NP métalliques, plus particulièrement les oxydes métalliques sous forme nanoparticulaire. En effet, d'un côté ce type de NP est très utilisé et développé pour de nombreux domaines (électronique, semiconducteur, textile, pigment), donc il existe de grands risques qu'elles se retrouvent dans l'environnement. De plus, il est à craindre que ces oxydes métalliques conservent leurs propriétés toxiques déjà connues pour de nombreux métaux ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ti}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ag}^{2+}$ ,  $\text{Au}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ...). Les effets toxiques des oxydes métalliques sous forme nanoparticulaire sur les organismes vivants sont très peu documentés. Cependant, il a été démontré que les NP de dioxyde de titane ( $\text{TiO}_2$ ) entraînaient l'agrégation des cellules de *Chlamydomonas reinhardtii*, la peroxydation des lipides par les ERO et l'inhibition de la croissance cellulaire (Wang *et al.*, 2008). Wang (2008) démontre aussi que les NP de  $\text{TiO}_2$  ont une taille moyenne originale de 21 nm, or après leur introduction dans le milieu de culture, il observe une agrégation massive des NP (taille moyenne > 800 nm). D'autre part, la toxicité des oxydes métalliques nanoparticulaires peut s'expliquer par le fait qu'elles relarguent leurs atomes métalliques sous forme ionique. Ainsi, les NP d'argent (AgNP, taille  $25 \pm 13$  nm) relâche dans le milieu de l'argent sous forme ionique qui affecte le rendement photosynthétique de *C. reinhardtii*, même si les AgNP forment des agrégats d'environ 1200 nm (Navarro *et al.*, 2008b). Il a été rapporté que les NP d'oxyde de Cu ( $\text{CuO}$ ), d'oxyde de Zn ( $\text{ZnO}$ ) et de  $\text{TiO}_2$  inhibent la croissance de *Pseudokirchneriella subcapitata*, une algue unicellulaire vivant en eau douce (Aruoja *et al.*, 2008). Il est important de distinguer les effets des NP par rapport aux effets des métaux relargués de ces NP. En effet, l'exposition du *Danio rerio* (poisson zèbre) à différentes concentrations de  $\text{CuO}$ -NP entraîne une inhibition des pompes ATPasique  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et la prolifération de cellules interlamellaires au niveau des branchies qui aboutit à la mort du poisson (Griffit *et al.*, 2007). En analysant le relarguage de

cuivre sous forme ionique et en comparant les effets, pour des concentrations similaires, pour le Cu ionique et Cu nanoparticulaire, Griffit (2007) conclut que les effets observés, dans ces conditions, sont principalement dûs à la forme nanoparticulaire. Une conclusion similaire a été proposée dans une étude comparant les effets du CuO-NP avec d'autres NP ( $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{CuZnFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , fullerenes) sur des cellules humaines de poumons (Karlsoon *et al.*, 2008). En effet, les CuO-NP entraînent un plus grand pourcentage de cellules non-viables que le Cu ionique (>80 % contre <20 % respectivement) pour une même concentration ( $[\text{Cu}] = 40 \mu\text{g/ml}$ ). De plus, le CuO-NP entraîne une plus grande mortalité cellulaire, d'important dommage à l'ADN et une plus forte production de ERO que les NP présentées plus haut (Karlsoon *et al.*, 2008).

## CHAPITRE II

### **PROJET DE RECHERCHE : APPLICATION DES PARAMÈTRES PHOTOSYNTHÉTIQUES DANS L'ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ DES NANOPARTICULES D'OXYDE DE CUIVRE ENCAPSULÉES ET DU DICHROMATE CHEZ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII***

L'objectif global de ce mémoire est d'utiliser les paramètres photosynthétiques, basé sur la fluorescence chlorophyllienne, pour étudier les mécanismes d'inhibition du transport des électrons photosynthétiques induit par le CS-CuO-NP ou le dichromate. De plus, la toxicité des métaux lourds est attribuable en partie au stress oxydatif dans les systèmes cellulaires (Quinlan *et al.*, 1988; Robinson *et al.*, 1994; Okamoto et Colepicolo, 1998; Adonaylo et Oteiza, 1999; Prasad et Dietz, 1999; Wang et Shi, 2001 ; Pinto *et al.*, 2003). Le stress oxydatif crée des dommages non spécifiques aux protéines, aux lipides et autres biomolécules (Stohs *et al.*, 2000; Schützendübel *et al.*, 2001). Conséquemment les effets des métaux au niveau cellulaire seront multiples. Ces effets ont des conséquences sur la concentration de chlorophylle qui entraînera la perturbation du transport d'électrons photosynthétique. De manière générale, les paramètres photosynthétiques demeurent un excellent indicateur de l'état physiologique des organismes photosynthétiques quand ils sont exposés aux métaux. Dans cet objectif de recherche, deux problématiques sont présentées dans les paragraphes suivants.

Notre projet de recherche consistera d'abord à mettre en évidence l'utilisation des paramètres photosynthétiques pour déterminer la toxicité des NP d'oxyde de cuivre encapsulée (CS-CuO-NP) sur l'algue verte, *C. reinhardtii*. Le CS-CuO-NP est une nanoparticule composée de deux phases, d'une part l'oxyde de cuivre (phase inorganique), d'autre part la phase organique qui encapsule l'oxyde métallique. Ce procédé d'encapsulation permet de maintenir l'intégrité de l'oxyde de cuivre en milieu aqueux, évitant ainsi, l'interaction des NP avec les ions en solution qui entraîneraient leur agrégation (Daigle et Claverie, 2008). L'agrégation étant limité par le processus d'encapsulation, cela permet de maintenir une importante surface de réactivité qui influencera sa toxicité (Fig 1.23). Le CS-CuO-NP est utilisé comme pigment dans les peintures antisalissures sur les coques de bateaux. Le CuO-NP a démontré une toxicité pour différents organismes algues unicellulaire, *Danio rerio* et cellules humaines



(Griffit *et al.*, 2007 ; Aruoja *et al.*, 2008 ; Karlsoon *et al.*, 2008). Cependant, les effets de CS-CuO-NP, sur la photosynthèse ou le métabolisme général d'une algue, demeurent cependant inconnus.

Le chapitre III présente l'évaluation des effets des nanoparticules d'oxyde de cuivre encapsulées sur la répartition de la dissipation d'énergie entre les différentes voies photochimique et non-photochimique d'une algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii*. Ce chapitre expose les résultats de l'influence de CS-CuO-NP sur la dissipation d'énergie au niveau du transport d'électron du photosystème II et sur la formation d'ERO de *C. reinhardtii*. La distribution de l'énergie lumineuse du PSII a été étudiée par la cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne, mettant ainsi en évidence les transitions entre les différents accepteurs et donneurs d'électrons du PSII. L'impact de toxicité sur la croissance cellulaire a été suivi par cytométrie avec en parallèle l'analyse des pigments par spectrophotométrie et des observations microscopiques courantes. La formation des ERO a été déterminée par l'utilisation d'un marqueur fluorescent spécifique du peroxyde d'hydrogène analysé par cytométrie en flux. De plus, le suivi du relargage du cuivre sous forme ionique a été suivi par absorption atomique. Les résultats obtenus et présentés dans le chapitre III, ont permis de mettre en évidence pour la première fois l'impact des nanoparticules d'oxyde de cuivre sur la photochimie d'une algue verte en utilisant les paramètres photosynthétiques.

Notre projet de recherche consiste aussi à étudier les mécanismes d'inhibition des réactions photochimiques des PSII et PSI par l'effet du dichromate. Le dichromate est une forme hexavalente du chrome et il est reconnu comme un composé hautement toxique (Pawlisz *et al.*, 1997). Le dichromate contamine les écosystèmes aquatiques car il est utilisé dans plusieurs activités industrielles comme la fabrication des pigments, le traitement des surfaces métalliques, le tannage du cuir et la préservation du bois (Heung *et al.*, 2007 ; Johnson *et al.*, 2006). En conséquence, le dichromate peut s'accumuler dans les écosystèmes aquatiques et induire une toxicité chez de nombreux organismes aquatiques (Pawlisz *et al.*, 1997). Au niveau de la photosynthèse des algues, la phytotoxicité du dichromate peut induire une inhibition de l'activité du PSII (Appenroth *et al.*, 2001). L'inhibition du transport d'électrons

photosynthétiques par le dichromate peut être causé par des effets des côtés donneur et accepteur du PSII (Ait Ali *et al.*, 2006). Cependant, les effets de cette inhibition de la photochimie du PSII sur la dissipation d'énergie au niveau des PSII et PSI ne sont pas bien connus. Il a été démontré que l'oxyde de cuivre nanoparticulaire et le dichromate peuvent causer une inhibition de la croissance chez les organismes photosynthétiques aquatiques (Peterson *et al.*, 1998 ; Shanker *et al.*, 2005 ; Aruoja *et al.*, 2008). Cette inhibition représente la conséquence de perturbations métaboliques au niveau cellulaire. Par conséquent, nous pouvons supposer que ces polluants peuvent affecter les réactions photochimiques du PSII et le transport des électrons photosynthétiques. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans cette inhibition ne sont pas encore bien connus.

Nous avons étudié les effets du dichromate, inhibiteur de l'activité photosynthétique du PSII, sur les mécanismes de dissipation d'énergie du PSII et du PSI. Dans cette partie, l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* a été exposée au dichromate pour évaluer les effets de l'inhibition du dichromate sur le transport d'électrons du PSII et du PSI. L'inhibition de la photochimie primaire du PSII a été évaluée par l'analyse de la cinétique rapide de fluorescence chlorophyllienne. Les différentes voies de dissipation d'énergie des PSII et PSI ont été aussi évaluées par la mesure de la cinétique de fluorescence modulée et par les changements d'absorption à 830 nm. Les propriétés structurelles du PSII ont été étudiées par analyse HPLC pour déterminer le changement des pigments photosynthétiques du LHC. Le « *Western Blot* » est utilisé pour déterminer les effets du dichromate sur le contenu en protéine D1 du PSII. Les effets de l'inhibition du transport d'électrons sur la distribution de la dissipation d'énergie des PSII et PSI seront évalués. Ces résultats nous permettront de mieux comprendre la dépendance entre les effets du dichromate et les changements apportés sur les mécanismes de dissipation d'énergie de l'appareil photosynthétique des algues. Les résultats obtenus nous ont permis d'utiliser plusieurs paramètres photosynthétiques comme indicateurs fiables et sensibles pour évaluer le niveau de toxicité induit par ce polluant. Les résultats de cette étude sont présentés au chapitre IV.

### CHAPITRE III

#### EFFECT OF CORE SHELL COPPER OXIDE NANOPARTICLES ON CELL CULTURE MORPHOLOGY AND PHOTOSYNTHESIS (PHOTOSYSTEM II ENERGY DISTRIBUTION) IN THE GREEN ALGA, *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*.

Cyril Saison<sup>a</sup>, François Perreault<sup>a</sup>, Jean-Christophe Daigle<sup>a,b</sup>, Claude Fortin<sup>c</sup>, Jérôme Claverie<sup>a,b</sup>,  
Mario Morin<sup>a,b</sup> and Radovan Popovic<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, 2101, Rue Jeanne Mance, Montréal, QC, Canada H2X 2J6.

<sup>b</sup> NanoQAM Research Center, Department of Chemistry, Université du Québec à Montréal, 2101, Rue Jeanne Mance, Montréal, QC, Canada H2X 2J6.

<sup>c</sup> Institut National de la Recherche Scientifique, Centre Eau, Terre et Environnement, Université du Québec, 490, rue de la Couronne, Québec, QC, Canada G1K 9A9.

\*Corresponding author.

Soumis et accepté à *Aquatic Toxicology*.

Contribution dans ce chapitre: Ma contribution dans ce chapitre est majeure. J'ai été le principal contributeur aux idées de cet objectif de recherche, à l'établissement du plan d'expérience, à la prise des résultats et j'ai écrit la première version du manuscrit. F. Perreault et J.C. Daigle ont participé à l'élaboration des idées de recherche. C. Fortin, J. Claverie, M. Morin et R. Popovic ont contribué à la rédaction de la version finale du manuscrit.

## 1. RÉSUMÉ

Les effets sur le système cellulaire des nanoparticules d'oxyde de cuivre encapsulées, ayant une taille inférieure à 100 nm, demeurent très peu connus. Étudier ces effets est crucial car les nanoparticules d'oxyde de cuivre encapsulées sont couramment utilisées dans les peintures antisalissures pour protéger les bateaux contre le développement des mollusques, algues et coquillages sur les coques. Cependant, l'utilisation de telle peinture peut induire d'importants dommages sur les différents niveaux trophiques des écosystèmes aquatiques qui seraient victimes du transfert de ces peintures dans l'environnement. Dans cette étude nous avons mis en évidence les effets des nanoparticules d'oxyde de cuivre encapsulée sur une algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii* avec une investigation particulière sur les changements dans la population cellulaire d'algues, la photochimie primaire du photosystème II et la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Quand une culture est exposée 6 h à 0.004, 0.01 et 0.02 g/l de nanoparticules d'oxyde de cuivre encapsulée, les changements dans la structure de la population d'algue et la formation d'espèces réactive de l'oxygène ont été déterminés par l'utilisation du 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate comme marqueur dans une analyse par cytométrie en flux couplée à des analyses microscopiques. Pour l'étude de la photochimie primaire du photosystème II, nous avons investigué le changement dans la cinétique rapide de fluorescence de la chlorophylle *a*. Nous avons trouvé que les nanoparticules d'oxyde de cuivre encapsulée induisent un processus d'agrégation cellulaire, une détérioration des pigments chlorophylliens entraînant la photoinhibition du photosystème II. L'inhibition du transport d'électrons photosynthétiques induit une forte dissipation de l'énergie par les voies non-photochimiques. Cette inhibition des processus photosynthétiques est interprétée pour due à la formation massive d'espèces réactive de l'oxygène induit par les nanoparticules d'oxyde de cuivre encapsulée. De plus, cette formation d'espèces réactives de l'oxygène n'est pas observée quand *C. reinhardtii* est exposée à l'oxyde de cuivre seul ou à la capsule seule.

## 2. ABSTRACT

The effect on cellular system of core-shell copper oxide nanoparticles having size smaller than 100 nm is still not well understood. Documenting these effects is pressing since core-shell copper oxide nanoparticles are currently component of pigment used frequently as antifouling paint protecting boat from shell, weed and slime fouling. However, the use of such paint may induce strong deteriorating effect on different aquatic trophic levels that are not targeted. Here, the toxic effect of core-shell copper oxide nanoparticles on the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii* was investigated with regards to the change of algal cellular population structure, primary photochemistry of photosystem II and reactive oxygen species formation. When algal culture exposed 6 h to 0.004, 0.01 and 0.02 g/L of core-shell copper oxide nanoparticles, the change in algal population structure and formation of reactive oxygen species was determined using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate as a marker used with flow cytometry measurement coupled with microscopic analysis. For the study of the photosystem II primary photochemistry we investigated the change of chlorophyll *a* rapid rise of fluorescence. We found that core shell copper oxide nanoparticles induce cellular aggregation processes, deteriorating effect on chlorophyll induce the photoinhibition of photosystem II. The inhibition effect of photosynthetic electron transport induced strong energy dissipation process via non-photochemical pathway. This strong deterioration of photosynthesis was interpreted to be caused by reactive oxygen species formation induced by core shell copper oxide nanoparticles. Moreover, this massive reactive oxygen species formation is not observed when *Chlamydomonas reinhardtii* is exposed to the core without shell or to the shell only.

Keywords: Nanoparticles, Toxicity, *Chlamydomonas reinhardtii*, Reactive oxygen species, Cells aggregation, Photosystem II, Chlorophyll content.

### 3. INTRODUCTION

The application of antifouling paints on the hulls of boats is a commonly used technique to reduce the growth and colonization of marine micro and macro organisms which are responsible for a decrease of boat speed and an increase in fuel consumption (Almeida *et al.*, 2007). A wide number of antifouling paints currently exist, many of them containing copper as the active element, either under the form of oxides ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ,  $\text{CuO}$ ), thiocyanates or copper metal flakes. It is widely thought that the effectiveness of the paint correlates with the flux of free cupric ions and other labile bioavailable copper species (Sandberg *et al.*, 2007). Copper oxide compounds are frequently used as antifouling agents since the dissolution of cuprous oxide ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) in sea water generates soluble copper species such as copper chloride,  $\text{CuCl}_2$  (Almeida *et al.*, 2007). It is generally accepted that, unlike cuprous oxide ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ), cupric oxide ( $\text{CuO}$ ) is not soluble enough to be a major source of dissolved copper-containing molecular species (Singh and Turner, 2009, Howell and Behrends, 2006). Antifouling coatings consists in polymeric films, made of mostly acrylic and styrenic monomers, covering copper oxides having size smaller than a few microns. The hull of boat is subject to weather and different environmental conditions, consequently, the core shell copper oxide nanoparticles contains in antifouling paint may be easily dispersed in the aquatic ecosystem. Several studies have tracked down the flux of species leaching out from these nanoparticle-containing coatings (Sandberg *et al.*, 2007, Singh *et al.*, 2009, Howell *et al.*, 2006). One of the difficulties associated with these kinds of studies is the slow leaching rate associated with the multiple numbers of copper based species diffusing freely in water. It is possible to put into contact a representative aquatic environment with a well defined component or set of components of the coating to assess its toxicity. However, this simplified system does not cover all the possible interactions between the contaminant and the ecosystem. It can be envisioned that this nanoparticle can either be free, or wrapped into a layer of coating. This latter case was recently modeled by us under the form of core-shell nanoparticles (Daigle and Claverie, 2008) where the core is made of  $\text{CuO}$  nanoparticles, and the shell is polystyrene. Polystyrene was chosen as a model of the polymeric matrix of the coating as it is often encountered in the composition of acrylic antifouling coatings.

Recently it has been reported for CuO nanoparticles to exhibit cytotoxic effects *in vitro* on human lung epithelial cells (Karlsson *et al.*, 2008). Some reports have shown that for nanoparticles, toxicity is not only related to the dissolved chemical speciation of the contaminant but also to the size and surface characteristics of the parent nanoparticle (Moore, 2006, Zhao *et al.*, 2007, Navarro *et al.*, 2008).

Contamination of the aquatic ecosystem by core-shell copper oxide nanoparticles (CS-CuO-NP) may raise questions concerning possible toxicity impact on algae as primary trophic level. Recently, it has been shown that different types of nanoparticles may be bioavailable to algae, bacteria and aquatic plants which consequently may induce toxic effects (Adams *et al.*, 2006, Navarro *et al.*, 2008). Interactions with cellular systems appeared to be dependent on nanoparticle surface properties and mobilities. However their mechanism of toxicity is mostly unknown and remains to be elucidated. For *Chlamydomonas reinhardtii*, titanium dioxide has been found to induce toxicity by causing lipid peroxidation and the deterioration of different cell compartments (Wang *et al.*, 2008). Interaction of CuO nanoparticles lacking coating with human lung epithelial cells induced ROS formation and DNA alteration (Karlsson *et al.*, 2008). In general, it is known for metal ions to inhibit photosynthetic electron transport due to ROS formation in algae which further more may affect cellular growth (Pinto *et al.*, 2003, Dewez *et al.*, 2005, Knauert and Knauer, 2006).

Algal cellular systems are convenient models to study the toxicity of nanoparticles because they have high contact surface area to volume ratio providing ability to absorb contaminant. In this paper, our aim is to demonstrate whether CS-CuO-NP could be potentially toxic to algal cell. Therefore, we have investigated the effect of CS-CuO-NP on *Chlamydomonas reinhardtii* growth and primary photochemistry. Furthermore we considered here also ROS formation induced by CS-CuO-NP and their deteriorating effects.

## 4. MATERIALS AND METHODS

### 4.1. Algal culture

*Chlamydomonas reinhardtii* (CC400 mutant provided from *Chlamydomonas* Genetic Center, Duke University, NC, USA) was grown in high salt medium (pH 6.8) following the procedure of Suekoa et al. (1967) except for the concentration of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CaCl}_2$ , which were set at 0.125, 0.02 and 0.013 g/L respectively. Growing was performed under continuous light intensity ( $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , SYLVANIA GRO-LUX Wide Spectrum light F40/GRQ/AQ/WS) at 23°C. The stock culture was aerated and maintained under moderate agitation during growth period. Aliquots of algal sample were used when cellular culture was in exponential growth phase.

### 4.2. Core-shell copper oxide preparation and its characterization

Details for the synthesis of CuO-polystyrene core-shell nanoparticles can be found in (Daigle and Claverie, 2008). For the preparation of the core-shell nanoparticles, 4 g of CuO provided of MTI Corporation (Richmond, CA, USA), 110 mg of polyacrylic acid prepared by reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization of acrylic acid ([AA] = 2.92M) as dispersant agent, mediated with trithiobenzyl carbonate as RAFT agent and 20 ml of nanopure water ( $\sigma = 18.1 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ). Sample was placed in a 50 ml beaker immersed in an ice bath. The mixture was stirred with a magnetic stir bar and sonicated during 3 min with a sonicator (VibraCell 400W) equipped with a microtip. Under those conditions an off-white dispersion of CuO in water was obtained. In a 250 ml round-bottom flask, styrene (4.0 ml), 51.5 mg of sodium dodecyl sulfate and 20.1 ml of the CuO dispersion were slowly stirred and degassed during 30 min by sparging it with argon. The mixture was heated at 80°C. A solution containing 40 mg of 4,4'-azobis-4-cyanovaleric acid, ACVA (radicalar initiator), three droplets of sodium hydroxide (30%) and 20.2 ml of ultrapure water was added continuously over 4 h ( $5 \text{ cm}^3/\text{h}$ ). The use of the sodium hydroxide was to increase the stability of the radicalar initiator (ACVA). When the addition was over, the mixture was kept at 80°C for 1 h in order to complete the reaction. The reaction medium was analyzed by gravimetry (14.8% solids), thermogravimetric analysis (TGA, weight composition: 67% core,



33% shell) and transmission electronic microscopy (TEM). TEM micrographs were obtained with a Tecnai 12 Biotwin microscope equipped with a W source (80 and 120 kV) and a 13 Mpixel Morada camera. The samples were obtained by depositing a dilute sample on a gold grid coated with a formvar film. No contrast agent was used. The images were analyzed using imageJ software developed by the NIH (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Low voltage (80 kV) favored contrast between the core and the shell, but higher voltage (120 kV) favored resolution at high magnification. Particle diameter measured by TEM was 81 nm (standard deviation 16 nm), and shell thickness was 14 nm (Fig. 3.1). The shell-only nanoparticles were prepared by repeating the above preparation while omitting the CuO nanoparticles. Atomic absorption analysis of treatment media was used to determine possible release of ionic copper from the CS-CuO-NP during the algal treatment. High speed centrifugation was used to separate media from nanoparticles.

#### **4.3. Algal exposure to core shell copper oxide nanoparticles (CS-CuO-NP)**

Aliquots of 50 ml of algal culture ( $1.10^6$  cells/mL) in growing media were exposed to 0.004, 0.01 and 0.02 g/L of CS-CuO-NP during 6 h under the same illumination and temperature conditions used for growing stock culture. For the control sample the same media was used but without presence of CS-CuO-NP. During the treatment, change in the ratio between cell number (biomass) and concentration of CS-CuO-NP was negligible.

#### **4.4. Using of ROS formation indicator**

For ROS determination the fluorescence dye 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate ( $H_2DCFDA$ ) was used as an indicator according to Knauert and Knauer (2006) and Gerber and Dubery (2003). The Fluorescence probe was purchased from Invitrogen Molecular Probe (Eugene, OR, USA). As a non polar compound, the sensor  $H_2DCFDA$  diffused into algal cells where it was transformed by intracellular esterases activity into non fluorescent form 2',7'-dichlorodihydrofluorescein ( $H_2DCF$ ). When ROS formation was induced, specifically with  $H_2O_2$ , within the cell,  $H_2DCF$  is converted into 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) having high intensity of fluorescence at 530 nm when exposed to a 488 nm excitation light. For fluorescence measurement FACScan flow cytometer was used (Becton Dickinson Instruments). Concentration of 10 mM  $H_2DCFDA$  stock solution was always freshly prepared

in ethanol, under dim light condition to avoid light deterioration effect. The evaluation of the change of ROS level compare to control was done by using:

Relative ROS sensor level (%) =  $1 + (\text{Mean DCF fluo. [NP-treated]} - \text{Mean DCF fluo. [Control]}) / \text{Mean DCF fluo. [Control]} \times 100$ , according to Hong et al. (2009).

The relative ROS sensor level represents the comparison between the DCF fluorescence of CS-CuO-NP treatments compared to the DCF fluorescence in the control. In this case, the relative ROS sensor level represents the percentage of increase ROS formation in the NP treatment compared to control.

#### **4.5. Measurements of rapid polyphasic fluorescence rise of chlorophyll *a* as indicator of PSII electron transport activity**

After the cell culture had been exposed for 6 h to CS-CuO-NP, an algal aliquot of 5 µg of total chlorophyll was layered on 13 mm glass fibre filter (Millipore). The deposition of algae on the filter (filtration under low pressure) did not induce additional physiological stress, which may affect fluorescence measurements (results not shown). The chlorophyll concentration of 5 µg was enough to form on the filter membrane a uniform chlorophyll layer without cellular aggregation. A Plant Efficiency Analyser fluorimeter (PEA, Hansatech Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK) was used to measure the rapid polyphasic chlorophyll *a* fluorescence change. Prior to filtration and fluorescence measurements algal cells were adapted to darkness for 20 min allowing an oxido-reduction equilibrium of PSII-PSI electron transport. To measure maximal PSII quantum yield, the excitation light intensity was 3500 µmol photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. The fluorescence yield at 50 µs was determined as a constant fluorescence value (F<sub>0</sub> fluorescence) while the fluorescence yield attained under saturating pulse was an indication to evaluate maximum fluorescence yield, F<sub>M</sub>. The fluorescence induction was investigated up to 6s allowing to determine fluorescence parameters : PSII effective antenna size (ABS) per active PSII reaction center (RC)  $ABS/RC = ((F_{300\mu s} - F_0) / 250\mu s) \times (1 / (F_{2ms} - F_0)) \times (F_M / (F_M - F_0))$  according to Strasser and Strasser (1995) and Strasser et al. (1999). Determination of effective energy dissipation not used for PSII photochemistry per active PSII reaction center was evaluated as  $DI_Q/RC = (ABS/RC) - (TR_Q/RC)$  where  $TR_Q/RC$  was maximal trapping rate of PSII according to Force et al. (2003). Photochemical capacity of PSII was evaluated by using complementary area (C.A.) above the fluorescence

induction up to  $F_M$  level (Lavorel and Etienne, 1977, Lavorel *et al.*, 1986, Samson *et al.*, 1988, Popovic *et al.*, 2003). Total chlorophyll was determined after extraction by 100% methanol at 65°C according to Lichtentaler (1987).

#### 4.6. Data analysis and statistics

The experiments were done in triplicates for all treatments. Means and standard deviations were determined for each treatment. Significant differences between control and nanoparticles treated sample were determined by using Student's *t*-test where *P* value less than 0.05 were considered to be significative compared to control.

### 5. RESULTS AND DISCUSSION

Cell aggregation induced by CS-CuO-NP was the highest at 0.02 g/L concentration (fig 3.2). Similar aggregation behavior has been reported for alluminium ions (Greger and Johansson, 2004). For aggregation effect it has been proposed to be part of a defense mechanism whereby algal population tend to decrease cell surfaces exposed to xenobiotics (Levy *et al.*, 2008). Similar aggregation process was also observed when *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* were exposed to microcystin (Mohamed, 2008). We found that CS-CuO-NP increases cellular granularity. The change of cellular granularity was dependant on the concentration of CS-CuO-NP (fig 3.3.A). We assume that granularity changes induced by CS-CuO-NP may be dependant also on aggregation processes. Indeed, the change in cellular granularity was correlated with the distribution of cellular size of the algal population (fig 3.3.B). Induced cell aggregation by these NP was observed even at the lowest concentration used. However, it is important to note that we found no change in individual cellular size compared to control with CS-CuO-NP treatment as in both cases, cellular size varied between 4.6 to 6.9  $\mu\text{m}$ . Also for *C. reinhardtii*, titanium dioxide NP was recently reported to induce cell aggregation characterised with deterioration of the cellular integrity via lipid peroxidation. It is considered that lipid peroxidation represented indirect evidence for ROS formation (Wang *et al.*, 2008). For such effect some recent evidence exists since when human cell culture was exposed to CuO-NP, ROS formation was indicated by  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  fluorescent probe (Karlsson *et al.*, 2008). In this study, we also used  $\text{H}_2\text{DCFDA}$

to indicate the presence of intracellular ROS when algae were exposed to CS-CuO-NP. High fluorescence emission of the ROS sensor ( $H_2DCFDA$ ), compared to the control, was found when *C. reinhardtii* was exposed to 0.02 g/L of CS-CuO-NP (fig 3.5.A). However, the core without shell and the shell without core did not induce significant ROS formation (fig. 3.4.A, B). It is known that ionic copper,  $Cu^{2+}$  may induce ROS formation (Knauert and Knauer, 2006). Here, it was of interest to find out those CuO-NP releases ionic forms of copper which may contribute to ROS formation. The analysis of the liquid phase of the sample (pH6.8) did not show any release of  $Cu^{2+}$  by CS-CuO-NP (results not shown, see material and methods). Very similar conclusion was done in the study of CuO-NP at pH6.6 (Bandara *et al.*, 2005).

We should mention that algae not treated with CS-CuO-NP showed always low fluorescence intensity (fig 3.5.A). Some level of fluorescence was found even when cell metabolism was in inactive state; induce by heat shock (Arsenault *et al.*, 1993). Therefore, in our analytical approach this yield of fluorescence was considered as a base. Strong dependency between intensity of fluorescence emission (induced by ROS sensor) and the presence of CS-CuO-NP concentration was evident. For example, at a concentration of 0.02 g/L of CS-CuO-NP, the relative ROS level was 350 % higher than in the control (fig 3.5.B).

We may expect that ROS formation by CS-CuO-NP was triggered by interaction with light, since it has been reported already for metal oxide nanoparticles of  $TiO_2$  and CuO, with semiconducting property, to induce ROS formation due to photocatalytic processes (Ichihashi and Matsumura, 2001, Bandara *et al.*, 2005, Banerjee *et al.*, 2006). Indeed when algae were treated with CS-CuO-NP in darkness, ROS formation was relatively negligible (fig. 3.5.B).

We may interpret that ROS formation by CS-CuO-NP was the main cause of alteration of cellular integrity. Here, the determination of the chlorophyll change was a convenient indicator for alteration of the photosynthetic apparatus. We found that chlorophyll content per cell, measured after 6 h of exposure to CS-CuO-NP (0.02 g/L) significantly decreased two-fold compared to control (fig. 3.6). It was evident that such decrease in chlorophyll content by CS-CuO-NP will induce alteration of primary photochemistry in photosynthesis. We found that complementary area above the variable fluorescence induction curve, as a reliable indicator of PSII electron transport activity, was decreased by 6 times at CS-CuO-NP treatment of 0.02 g/L which indicated strong inhibition of the PSII photochemistry (fig 3.7.A). It is worth mentioning that the yield of variable fluorescence beyond  $F_M$  transition, at

3 s of illumination, was not quenched when algae were exposed to CS-CuO-NP. This is evidence that remaining PSII RC was in closed state since electron transport from PSII toward to PSI was inhibited. Furthermore, the fluorescence yield at J transition was highly decreased by CS-CuO-NP showing that electron transport from water splitting system to  $Q_A$  reduction was negligible. This explanation is in agreement with interpretation of PSII rapid fluorescence rise and photosynthetic electron transport (Lazar, 1999, Strasser *et al.*, 2000, 2004). It appeared that concentration of 0.004 g/L of CS-CuO-NP does not induce alteration of photosynthetic activity. This was expected since this concentration of CS-CuO-NP did not result in ROS formation. This negative result was supporting interpretation that alteration processes were induced by ROS formation. We further analysed the consequences how ROS altering effect may affect the energy distribution in photosynthesis. At CS-CuO-NP concentrations higher or equal to 0.01 g/L, PSII electron transport toward PSI is greatly reduced (fig 3.7.B). Strong decrease of PSII primary photochemistry and electron transport will further alter energy dissipation in photosynthesis. When PSII RC have been mostly inactivated, the chlorophyll content per remaining active PSII RC (ABS/RC) became larger which indicated that deterioration of chlorophyll is slower than inactivation of PSII RC induced by ROS effect. Since most of the light energy absorbed by chlorophyll in antenna complex is not converted via a photochemical pathway the energy dissipation was changed via non-photochemical process. Indeed at a concentration of 0.02 g/L, remaining chlorophyll per PSII RC (ABS/RC) increased by 50% and non-photochemical energy dissipation ( $DI_0$ /RC) per active RC increased by 100% when CS-CuO-NP (fig. 3.8). Therefore, here we have demonstrated that unlike uncoated CuO nanoparticles and shell-only nanoparticles, CS-CuO-NPs participate in ROS formation and consequently deterioration of the photosynthetic activity of *C. reinhardtii*.

## 6. CONCLUSIONS

Core-shell copper oxide nanoparticles induced aggregation processes in algal *C. reinhardtii* cultures after relatively short exposure periods of 6 h. This indicated that *C. reinhardtii* is able to change relatively fast structure properties as a response to the presence of CS-CuO-NP. These nanoparticles of CS-CuO-NP are capable of causing alteration of intracellular function by inducing ROS formation. It was evident that under these conditions ROS are

responsible for chlorophyll deterioration and significant decrease of the PSII primary photochemistry in algal photosynthesis. Due to the significant damage of the photosynthetic apparatus, light energy was mostly dissipated via non photochemical processes.

This study demonstrated the possibility for core-shell copper oxide nanoparticles to induce strong toxic effects at the cellular level for algae. It is important to mention that neither the copper oxide nanoparticle nor the organic shell alone did exhibit such effect. Therefore we demonstrate here that morphological property plays an important role in possible induction of toxic effect. The results in this study showed that copper oxide nanoparticles are toxic on algal cellular system only if they are wrapped into an organic polymeric layer. This indicated that not only the chemical speciation of nanoparticle but surface properties may determine toxic effects. This result may support interpretation that deteriorating effect of CS-CuO-NP was due to photocatalytic activity causing ROS formation similarly seen earlier for CuO-NP (Bandara *et al.*, 2005).

## 7. ACKNOWLEDGMENT

We thank Wei Heng Zhong for his technical assistance.

## 8. REFERENCES

- Adams, L. K., D. Y. Lyon et P.J.J. Alvarez. 2006. "Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, and ZnO water suspensions". *Water Res.*, vol. 40, p. 3527-3532.
- Almeida, E., T. Diamantino et O. de Sousa. 2007. "Marine paints: the particular case of antifouling paints". *Prog. Org. Coatings*, vol. 59, p. 2-20.
- Arsenault, G., A.D. Cvetkovic et R. Popovic. 1993. "Toxic effects of copper on *Selenastrum capricornutum* measured by a flow cytometry-based method". *Water Poll. Res. J. Canada*, vol. 28, p. 757-765.
- Bandara, J., I. Guasaquillo, P. Bowen, L. Soare, W.F. Jardim et J. Kiwi. 2005. "Photocatalytic storing of O<sub>2</sub> as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediated by high surface area CuO. Evidence for reductive-oxidative interfacial mechanism". *Langmuir*, vol. 21, p. 8554-8559.
- Banerjee, S., J. Gopal, P. Muraleedharan, A.K. Tyagi et B. Raj. 2006. "Physics and chemistry of photocatalytic titanium dioxide: Visualization of bactericidal activity using atomic force microscopy". *Curr. Sci.*, vol. 90, p. 1378-1383.

- Daigle, J.-C. et J.P. Claverie. 2008. "A simple method for forming hybrid core shell nanoparticles suspended in water". *J. Nanomaterials*, vol. 2008, p. 1-8.
- Dewez, D., L. Geoffroy, G. Vernet et R. Popovic. 2005. "Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*". *Aquat. Toxicol.*, vol. 74, p. 150-159.
- Force, L., C. Critchley et J.J.S. van Rensen. 2003. "New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants: 1. The effect of illumination on the fluorescence parameters of the JIP-test". *Photosynth. Res.*, vol. 78, p. 17-33.
- Gerber, I.B. et I. A. Dubery. 2003. "Fluorescence microplate assay for the detection of oxidative burst products in tobacco cell suspensions using 2',7'-dichlorofluorescein". *Meth. Cell Sci.*, vol. 25, p. 115-122.
- Greger, M. et M. Johansson. 2004. "Aggregation effects due to aluminium adsorption to cell walls of the unicellular green alga *Scenedesmus obtusiusculus*". *Phycol. Res.*, vol. 52, p. 53-58.
- Handy, R. D., R. Owen et E. Valsami-Jones. 2008. "The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs". *Ecotox.*, vol. 17, p. 315-325.
- Hong, Y., H.-Y. Hu, X. Xie, A. Sakoda, M. Sagehashi et F.-M. Li. 2009. "Gramine-induced growth inhibition, oxidative damage and antioxidant responses in freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*". *Aquat. Toxicol.*, vol. 91, p. 262-269.
- Howell, D. et B. Behrends. 2006. "A methodology for evaluating biocide release rate, surface roughness and leach layer formation in a TBT-free, self-polishing antifouling formulation". *Biofouling*, vol. 22, p. 303-315.
- Ichihashi, Y. et Y. Matsumura. 2001. "Partial photooxidation of ethylene with water as oxidant over copper oxide supported on silica". *J. Catalysis*, vol. 202, p. 427-429.
- Karlsson, H.L., P. Cronholm, J. Gustafsson et L. Möller. 2008. "Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes". *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 21, p. 1726-1732.
- Knauert, S. et K. Knauer. 2006. "The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae". *J. Phycol.*, vol. 44, p. 311-319.
- Lavorel, J., J. Breton et M. Lutz. 1986. "Methodological principles of measurement of light emitted by photosynthetic systems". In *Light emission by plants and bacteria*, Govindjee, Amesz, J., Fork, D.C. (eds.), Academic Press, San Diego, CA., pp. 57-98.

- Lavorel, J. et A.-L. Etienne. 1977. "In vivo chlorophyll fluorescence". In *Primary processes of photosynthesis*, J. Barber (eds.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, Netherlands, pp. 203-268.
- Lazar, D. 1999. "Chlorophyll a fluorescence induction". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1412, p. 1-28.
- Levy, J.L., B.M. Angel, J.L. Stauber, W.L. Poon, S.L. Simpson, S.H. Cheng et D.F. Jolley. 2008. "Uptake and internalisation of copper by three marine microalgae: Comparison of copper-sensitive and copper-tolerant species". *Aquat. Toxicol.*, vol. 89, p. 82-93.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. "Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes". *Meth. Enzymol.*, vol. 148, p. 350-383.
- Mohamed, Z.A. 2008. "Polysaccharides as a protective response against microcystin-induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significance in the aquatic ecosystem". *Ecotox.*, vol. 17, p. 504-516.
- Moore, M.N. 2006. "Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment ?". *Environ. Int.*, vol. 32, p. 967-976.
- Navarro, E., A. Baun, R. Behra, N. B. Hartmann, J. Filser, A.-J. Miao, A. Quigg, P. H. Santschi et L. Sigg. 2008. "Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi". *Ecotox.*, vol. 17, p. 372-386.
- Pinto, E., T.C.S. Sigaud-Kutner, M.A.S. Leitão, O.K. Okamoto, D. Morse et P. Colepicolo. 2003. "Heavy metal-induce oxydative stress in algae". *J. Phycol.*, vol. 39, p. 1008-1018.
- Popovic, R., D. Dewez et P. Juneau. 2003. "Applications of chlorophyll fluorescence in ecotoxicology: Heavy metals, herbicides, and air pollutants". In *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*, Toivonen, P., DeEll, J. (eds.), Kluwer Academic Publisher, pp. 152-179.
- Samson, G. et R. Popovic. 1988. "Use of algal fluorescence for determination of phytotoxicity of heavy metals and pesticides as environmental pollutants". *Ecotox. Environ. Safe.*, vol. 16, p. 272-278.
- Sandberg, J., I. Odenvall Wallinder, C. Leygraf et M. Virta. 2007. "Release and chemical speciation of copper from anti-fouling paints with different active copper compounds in artificial seawater". *Mater. Corros.*, vol. 58, p. 165-172.
- Singh, N. et A. Turner. 2009. "Leaching of copper and zinc from spent antifouling paint particles". *Environ. Pollut.*, vol. 157, p. 371-376.



- Strasser, B.J., H. Dau, I. Heinze et H. Senger. 1999. « Comparison of light induced and cell cycle dependant changes in photosynthetic apparatus: a fluorescence induction study on the green alga *Scenedesmus obliquus* ». *Photosynth. Res.*, vol. 60, p. 217-227.
- Strasser, B.J. et R.J. Strasser. 1995. "Measuring fast fluorescence transients to adress environmental questions: the JIP-test". In *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, Mathis, P. (ed.), 5. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 977-980.
- Strasser, R. J., A. Srivastava et M. Tsimilli-Michael. 2000. "The fluorescence transient as tool to characterize and screen photosynthetic samples". In *Probing photosynthesis: mechanisms, regulation and adaptation*, M. Yunus, U. Pathre et P. Mohanty, (Eds). Taylor and Francis, London. pp. 445-483
- Strasser, R.J., A. Srivastava et M. Tsimilli-Michael. 2004. "Analysis of the chlorophyll fluorescence transient". In *Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and respiration*, G. Papageorgiou, Govindjee (Eds), The Netherlands : Kluwer Academic Publishers, vol. 19, pp. 321-362.
- Sueoka, N., K.S. Chiang et J.R. Kates. 1967. „Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores". *J. Mol. Biol.*, vol. 25, p. 44-67.
- Wang, J., X. Zhang, Y. Chen, M. Sommerfeld et Q. Hu. 2008. "Toxicity assessment of manufactured nanomaterials using the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*". *Chemosphere*, vol. 73, p. 1121-1128.
- Zhao, Y., H. Meng, Z. Chen, F. Zhao et Z. Chai. 2007. "Biological activities of nanomaterials/nanoparticles". In *Nanotoxicology: Interactions of nanomaterials with biological systems*, Zhao, Y., Nalwa, H. S., (eds). American Scientific Publishers, CA, USA, pp. 1-28.

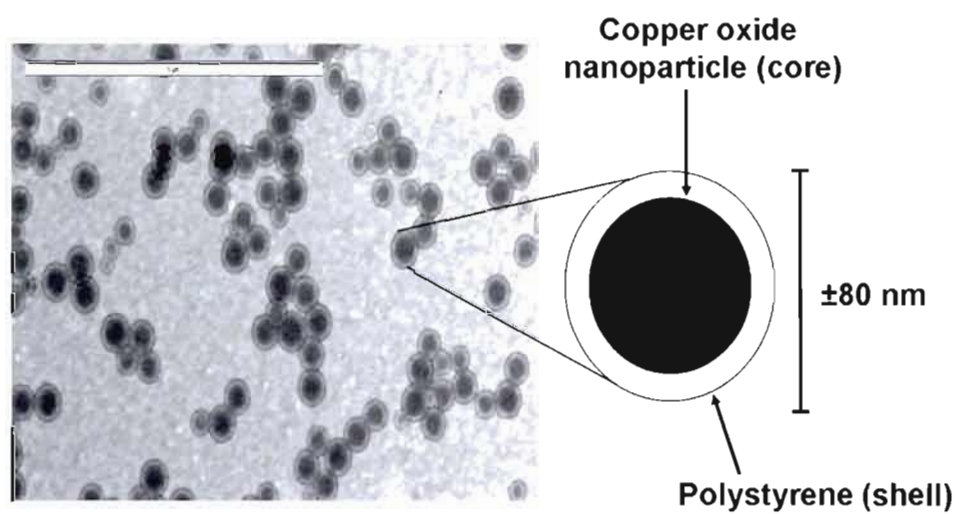


Figure 3.1: TEM micrograph of core shell polystyrene-copper oxide nanoparticles (bar = 1 micron).

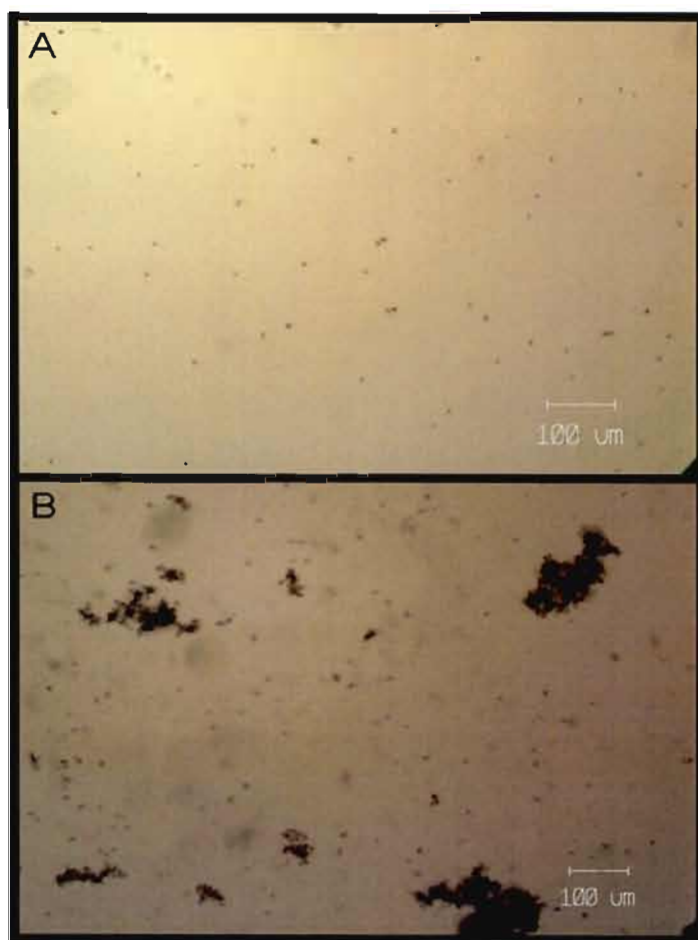


Figure 3.2: Microscopic image of *C. reinhardtii* culture, **A**: control cells and **B**: cells exposed to 0.02 g/L of CS-CuO-NP during 6 h.

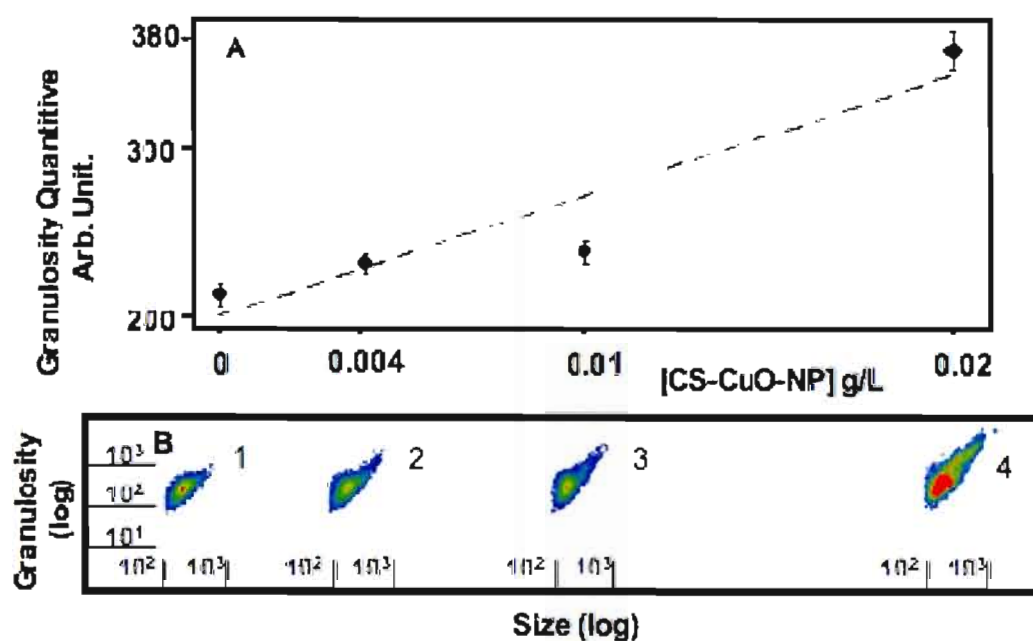


Figure 3.3: The change of granularity of cellular *C. reinhardtii* when it has been exposed to 0.004, 0.01 ( $P < 0.05$ ) and 0.02 ( $P < 0.05$ ) g/L of CS-CuO-NP. **A:** The ratio granulosity versus CS-CuO-NP concentration. **B:** Ratio between distribution of cell granulosity and size value. Numbers 1, 2, 3 and 4 represent 0 (control), 0.004, 0.01 and 0.02 g/L of CS-CuO-NP respectively.

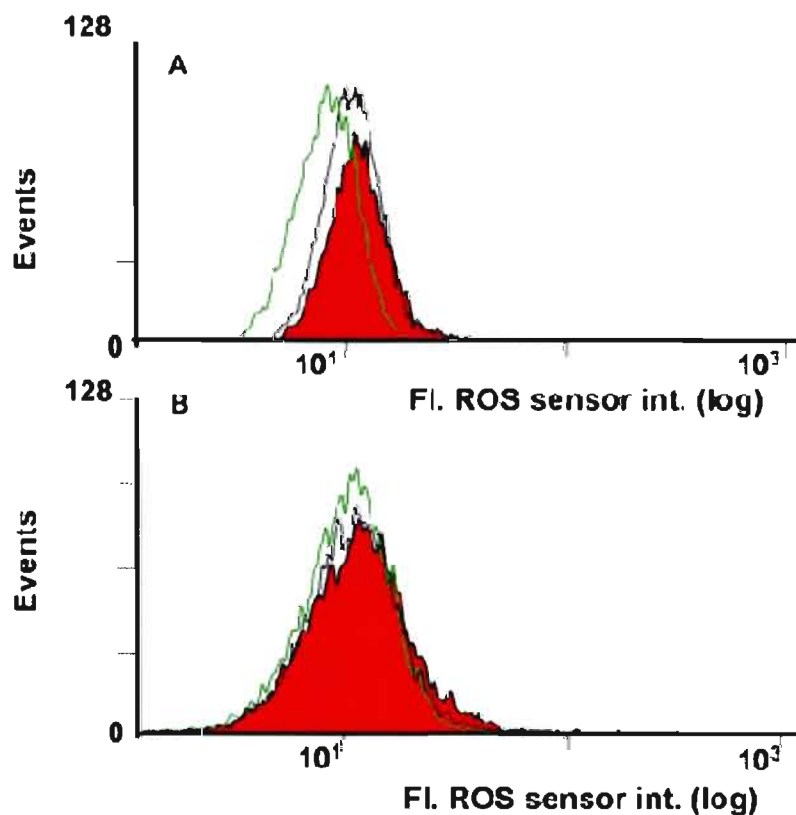


Figure 3.4: Fluorescence intensity distribution of ROS sensor ( $H_2DCFDA$ ) when *C. reinhardtii* culture exposed 6 h to copper oxide nanoparticles, **A**: the core complex, without polystyrene shell and **B**: shell complex of polystyrene alone without copper oxide nanoparticles. The different distribution represents the control (green line), 0.01 (black line) and 0.02 (red/black line) g/L of CS-CuO-NP.

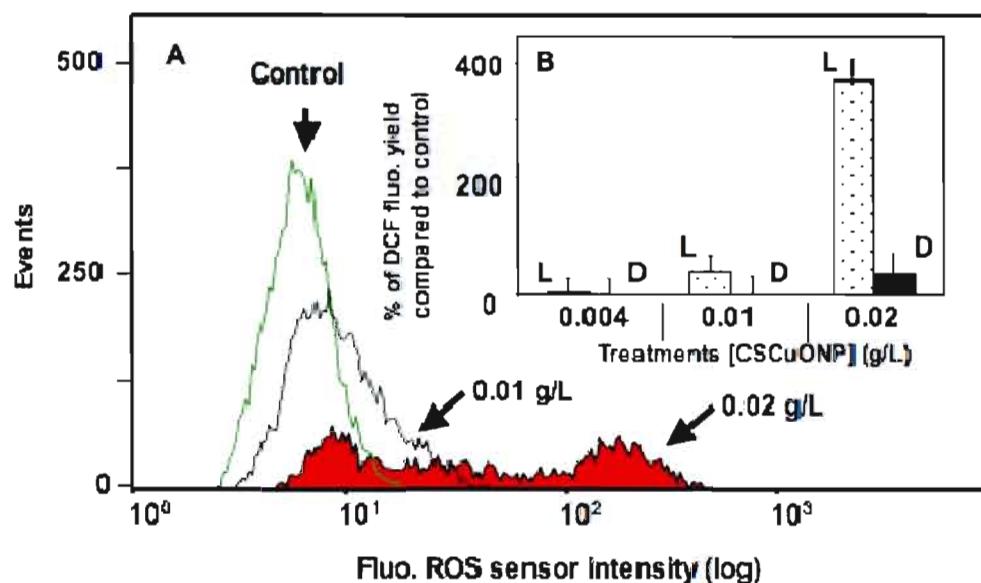


Figure 3.5: **A**: Fluorescence intensity distribution of ROS sensor (H<sub>2</sub>DCFDA) when *C. reinhardtii* culture was exposed to 0.01 and 0.02 g/L of core shell copper oxide nanoparticles. **B**: Increase of the relative intensity of ROS sensor fluorescence emission compared to control when algal culture was exposed to 0.004, 0.01 ( $P < 0.05$ ) and 0.02 ( $P < 0.05$ ) g/L of CS-CuONP. **L** and **D** represent light and dark treatments respectively.

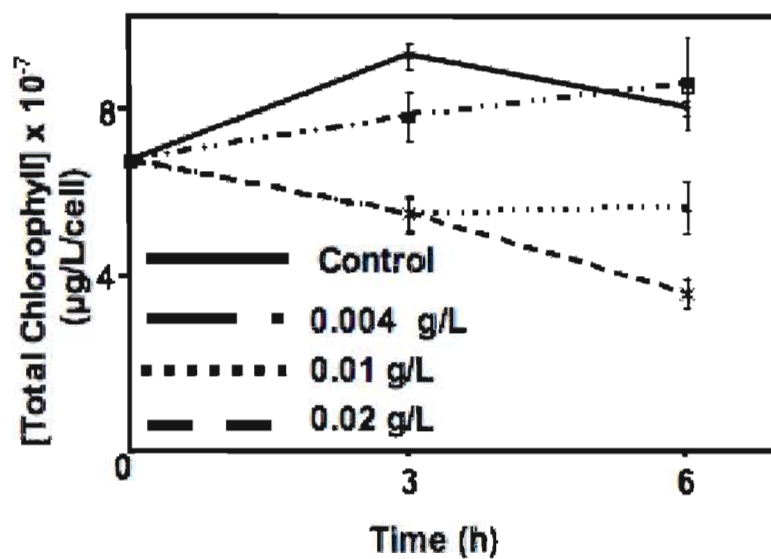


Figure 3.6: Changes in total chlorophyll content in *C. reinhardtii* cell when it has been exposed to 0, 0.004, 0.01 ( $P < 0.05$ ) and 0.02 ( $P < 0.05$ ) g/L of CS-CuO-NP.

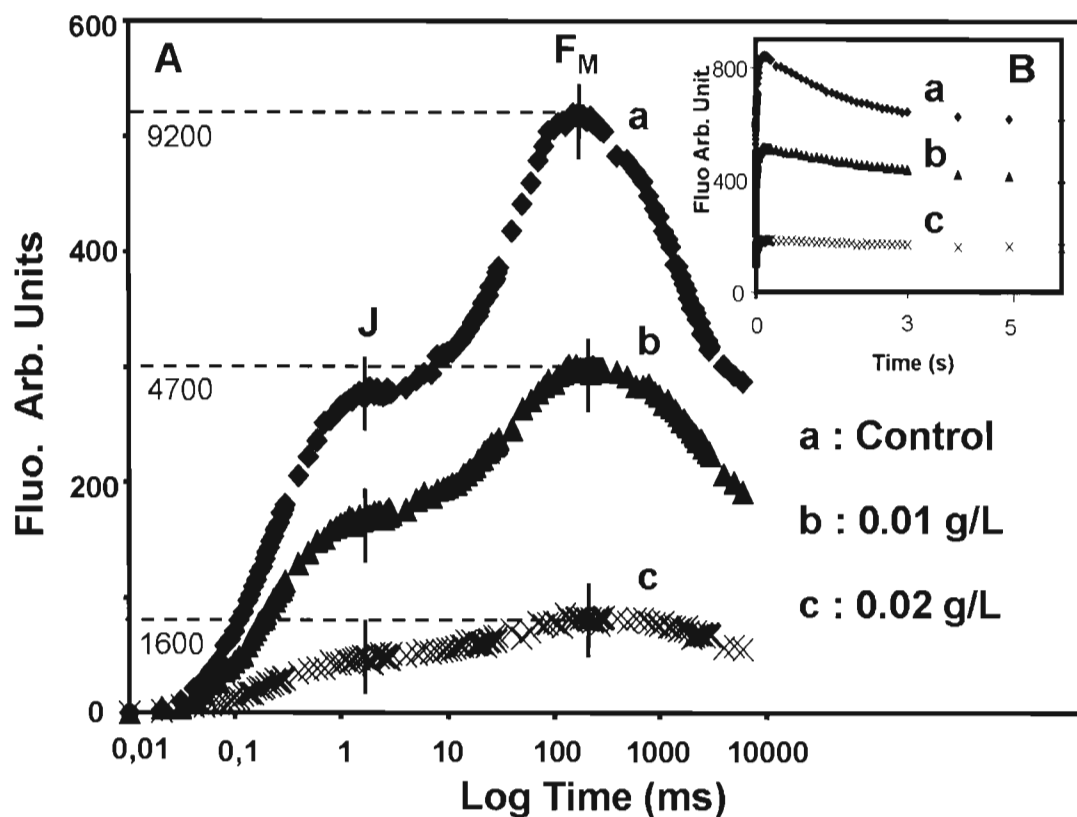


Figure 3.7: The change of chlorophyll *a* fluorescence when *C. reinhardtii* is exposed during 6 h to control (a), 0.01 (b) and 0.02 (c) g/L of CS-CuO-NP. A Fluorescence transition J and  $F_M$  during rapid rise of chlorophyll *a* fluorescence. Panel B represents linear scale of fluorescence emission for the same treatments.



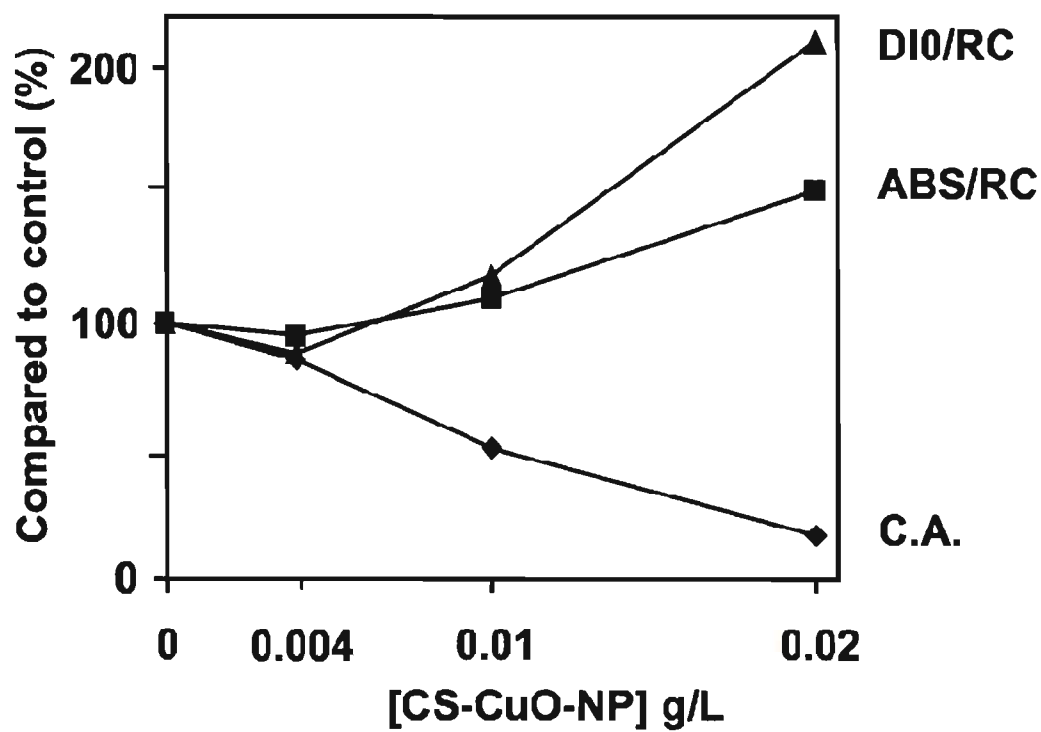


Figure 3.8: The change in photosynthetic fluorescence parameter values of DI0/RC, ABS/RC and C.A. when *C. reinhardtii* is exposed to CS-CuO-NP during 6 h (for more details concerning fluorescence parameters see materials and methods).

## CHAPITRE IV

### INHIBITION OF PHOTOSYNTHETIC ELECTRON TRANSPORT IN *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* BY DICHROMATE EFFECT ALTERS ENERGY DISSIPATION PROCESSES DEPENDANT TO PSII AND PSI ACTIVITIES

Perreault François<sup>1</sup>, Ait Ali Nadia<sup>1</sup>, **Saison Cyril**<sup>1</sup>, Popovic Radovan<sup>1</sup> and Juneau Philippe<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, University of Quebec in Montreal, C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec, H3C 3P8 Canada.

<sup>2</sup> Department of Biological Sciences-TOXEN, Canadian Research Chair on Ecotoxicology of Aquatic Microorganisms, University of Quebec in Montreal, C.P. 8888, Succ. Centre-Ville, Montreal, Quebec, H3C 3P8 Canada.

\* Corresponding author

Publié dans *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology*

Contribution: Dans ce chapitre, j'ai participé à la rédaction de la version finale du manuscrit et à la prise des résultats expérimentaux.

## 1. RÉSUMÉ

Dans cette étude, nous avons investigué les processus de dissipation d'énergie du PSII et du PSI chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* lorsque le transport d'électron photosynthétique est inhibé par le dichromate. Le changement du contenu en protéine D1, de la composition des pigments ainsi que le transport des électrons et les processus de dissipation d'énergie des photosystèmes II et I ont été étudiés lorsque les algues ont été exposées à différentes concentrations de dichromate en présence de lumière. Après 24h d'exposition, une diminution du contenu en protéine D1 et une augmentation du ratio zeaxanthine / chlorophylle  $a + b$  indiquent des changements structuraux du photosystème II. Les rendements photochimiques des photosystèmes II et I ont fortement diminué. Cette inhibition par le dichromate a induit un fort quenching de la fluorescence aux transitions O-J-I-P, ce qui indique une détérioration du transport d'électron du PSII vers les plastoquinones et le PSI. Cette étude montre que le dichromate augmente la dissipation par voie non-photochimique non-régulée du PSII. Cependant, nous avons aussi trouvé que la dissipation d'énergie par la voie photochimique pour le PSI était limitée par son côté accepteur d'électron en présence de dichromate. Ces résultats indiquent que le dichromate, en plus d'agir comme inhibiteur du PSII, possède un autre site d'action situé soit au niveau des accepteurs d'électrons du PSI ou des réactions biochimiques permettant l'oxydation du NADPH.

## 2. ABSTRACT

In this study, we investigated the energy dissipation processes via PSII and PSI activity in green alga *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to dichromate inhibitory effect on electron transport. The changes of D1 protein content, pigment composition, photosystem II–I electron transport and energy dissipation processes were studied when algae were exposed to different dichromate concentrations in the presence of light. After 24h of exposure, the decrease of D1 protein content and the increase of the zeaxanthin / chlorophyll *a* + *b* ratio indicated structural changes of photosystem II. Quantum yield of Photosystem II and Photosystem I were highly decreased. Such inhibition by dichromate induced strong quenching effect at rapid O-J-I-P fluorescence transients, indicating deterioration of PSII electron transport toward to PQ pool and PSI. This investigation shows that dichromate increase energy dissipation via non-regulated non-photochemical energy dissipation in PSII. However, we found that energy dissipation via PSI photochemical activity was limited by its electron acceptor side. This indicates that dichromate, in addition to its inhibition effect on PSII, have a sensitive inhibitory site located either on PSI electron acceptors or on the dark reactions of photosynthesis responsible of NADPH oxidation.

**Keywords:** *Chlamydomonas reinhardtii*, photosynthesis, dichromate toxicity, heavy metals stress, Photosystem II, Photosystem I, energy dissipation processes, photosynthetic electron transport.

### 3. INTRODUCTION

Chromium accumulation in aquatic ecosystems and industrial effluents may reach from 10  $\mu\text{M}$  to 96 mM (De Filipis and Pallaghy, 1994; Chandra *et al.*, 1997). Chromate and dichromate, as hexavalent forms of chromium, are known to induce strong toxic effects on phytoplankton organisms (Pawlisz *et al.*, 1997). Strong inhibition of photosystem II (PSII) electron transport may indicate high sensitivity of photosynthetic electron transport to dichromate effect (Hörcksik *et al.*, 2007). Alteration of D1 protein and 33 kDa protein of oxygen evolving complex by dichromate effect gave evidences that the inhibition sites may be located on oxidizing and reducing sides of PSII (Ait Ali *et al.*, 2006). However, presently there is no indications how dichromate inhibitory effect may alter PSII and I energy dissipation processes occurring by non-photochemical pathways or reactive oxygen species (ROS) formation. It was noticed that dichromate deteriorating effect on PSII was similar to photoinhibition processes induced in plants treated with cadmium or copper (Pätsikkä *et al.*, 2002; Pagliano *et al.*, 2006). Usually, photoinhibition of PSII occurs under excessive light conditions when the amount of absorbed light energy exceeds the capacity of energy dissipation pathways in the photosynthetic apparatus (Kato *et al.*, 2003). It is known that under those conditions, the excess energy will dissipate from singlet and triplet states of antenna chlorophylls inducing ROS, which may cause protein alteration of PSII complex (Dat *et al.*, 2000). Formation of ROS by excess light energy can be prevented via heat energy dissipation as non-photochemical quenching (NPQ) processes (Müller *et al.*, 2001). A major component of heat dissipation is regulated via the xanthophyll cycle, where violaxanthin is reversibly transformed into zeaxanthin (Demmig-Adams, 1990). Zeaxanthin can accept excitation energy directly from light harvesting antenna chlorophylls or react with PSII light-harvesting complexes (LHCII) inducing conformational changes of protein-pigment complexes favorable for heat dissipation (Niyogi, 2000). It also appeared that zeaxanthin, beside NPQ-dependant photoprotective role, has an antioxidant function preventing deteriorating effects of ROS formation (Havaux and Niyogi, 1999; Baroli *et al.*, 2003). However, it has been earlier reported that photoinhibition processes can also occur under moderate light intensity when the photosynthetic activity is altered by heavy metals or pesticides (Rutherford and Kriger-Lisazkay, 2001; Bertrand and Poirier, 2005).

Photosynthesis of higher plants and algae can adapt remarkably to various environmental conditions by using different energy dissipation mechanisms (Demmig-Adams and Adams, 2006). It has been found that short exposure of *Fucus serratus* to copper increased PSII non-photochemical energy dissipation (Nielsen *et al.*, 2003). In cadmium treated plants showing inhibition of photosynthetic electron transport and increase of energy dissipation via heat, higher ratio between xanthophyll pigments (antheraxanthin and zeaxanthin) and chlorophyll *a* was found (Otero *et al.*, 2006). This may indicate for accessory pigments of LHC, as a regulatory system, to participate in dissipation of excess light energy when photosynthetic electron transport was inhibited by metals. Beside inhibition of PSII electron transport, it has been recently suggested that oxidative stress induced by dichromate could be additionally caused by an alteration of photosystem I (PSI) acceptor side (Hörscik *et al.*, 2007). However, we are far away from understanding how those dichromate inhibitory effects have impact on energy dissipation associated with PSII and PSI electron transport processes.

In this study, we investigated the processes of energy dissipation via PSII and PSI activity in green alga *Chlamydomonas reinhardtii* when the change of functional and structural properties of the photosynthetic apparatus was induced by dichromate inhibitory effect.

## 4. MATERIALS AND METHODS

### 4.1. Algae culture

*C. reinhardtii* culture was obtained from the *Chlamydomonas* Genetic Center (Duke University, Durham, NC). Cells were cultivated in batch culture of 500 mL high salt growth medium (Harris, 1989), under continuous illumination ( $100 \pm 5 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) provided by white fluorescent lamps (Sylvania® GroLux F 36 W) at  $26 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ . The algal culture was permanently aerated to obtain constant  $\text{CO}_2$  concentration in the growing medium. When the algal culture was in the exponential growth phase, a sample having a cell density of  $5 \times 10^7 \text{ cells mL}^{-1}$  was used in this study.

## 4.2. Dichromate treatment

Stock solution (20 mM) was made with  $K_2Cr_2O_7$  salt dissolved in culture media. Dichromate treated algal samples were prepared with growth medium in final volume of 100 ml where initial cell density was  $5 \times 10^5$  cells  $ml^{-1}$ . The algal samples were exposed during 24h to 0, 6 and 12.5  $\mu M$  dichromate under the same conditions as used during growth period.

## 4.3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting

Proteins of thylakoid membranes were separated by SDS-PAGE according to Laemmli (1970). D1 protein content was evaluated by using 7  $\mu g$  total thylakoid protein determined by BCA assay (Pierce). The primary antibody used for Western blot analysis was against D1 protein (Agrisera). As secondary antibody, horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (Amersham Biosciences) was used to detect the immuno-reaction as described earlier (Ait Ali *et al.*, 2006).

## 4.4. Chlorophyll *a* fluorescence and PSI transmittance measurement

Prior to fluorescence measurements, treated algal samples were dark-adapted for 15 min. Samples of algal cells (16  $\mu g$  of Chl *a*) were uniformly placed on glass fiber filter (Millipore #AP20 013 00) by using low pressure filtration to avoid physiological stress effect and to obtain reproducible results. The Plant Efficiency Analyzer fluorometer (PEA, Hansatech Ltd., UK) was used to measure the rapid polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise during 6 sec by using light intensity of 2500  $\mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ . Fluorescence yield (F) at investigated fluorescence transients we determined according to Strasser and Strasser (1995). The fluorescence yield at 50 $\mu s$  was considered as O transient ( $F_{50\mu s}$ ) when all reaction centers of PSII are open. The maximal fluorescence yield,  $F_M$  was determined at P transient and the variable fluorescence yields related to J and I transients were determined at 2 ms and 30 ms respectively. Photosynthetic parameters indicating PSII activity were evaluated (Strasser and

Strasser, 1995; Strasser *et al.*, 1999) : (1) the absorption of photons (ABS) per active reaction center (RC) showing the antenna size was estimated by the ratio  $ABS/RC = (M_0/V_J)/((F_M - F_{50\mu s})/F_M)$ ; (2) the non-photochemical energy dissipation per active reaction center as  $DI_0/RC = ABS/RC - (M_0/V_J)$ ; (3) the PSII capacity for photosynthetic electron transport as  $S_M$  = complementary area above the fluorescence induction curve normalized by  $F_V$ ; (4) the quenching of PSII fluorescence related to oxydized quinones of the PQ pool  $qPQ = (F_M - F_{30ms}) / (F_M - F_{50\mu s})$ . For those parameters,  $M_0$  value, as an indication of the water splitting system function, was estimated as  $M_0 = [4 \times (F_{300\mu s} - F_{50\mu s}) / (F_M - F_{50\mu s})]$  and  $V_J$ , the relative fluorescence quantum yield at J transient as  $V_J = (F_{2ms} - F_{50\mu s}) / (F_M - F_{50\mu s})$  was used as indication for PSII efficiency in primary photochemistry (for a review see Strasser *et al.* (2004)). Deconvolution of rapid rise transitions states O-J, J-I and I-P were done by using a sum of three exponential functions :  $F(t) = F_{50\mu s} + A_{O-J}(1 - e^{-(k_{O-J}t)}) + A_{J-I}(1 - e^{-(k_{J-I}t)}) + A_{I-P}(1 - e^{-(k_{I-P}t)})$  where  $F_0$  is the minimal fluorescence;  $A_{O-J}$ ,  $A_{J-I}$  and  $A_{I-P}$  were amplitudes of each transition step;  $k_{O-J}$ ,  $k_{J-I}$  and  $k_{I-P}$  were rate constants of the O-J, J-I and I-P phase, respectively, according to Pospisil and Dau (2002).

Chlorophyll fluorescence yields at steady-state were measured at room temperature by using dual-wavelength pulse-amplitude-modulated fluorescence monitoring system (Dual-PAM, Heinz Walz, Effeltrich, Germany) according to Schreiber *et al.* (1986). Used modulated, actinic and saturating pulses (0.8 s) light intensities were  $1 \mu E m^{-2} s^{-1}$ ,  $100 \mu E m^{-2} s^{-1}$  and  $3000 \mu E m^{-2} s^{-1}$ , respectively. PSII maximal quantum yield was evaluated as  $\Phi_{MII} = (F_M - F_0)/F_M$  (Kitajima and Butler, 1975). The effective quantum yield of PSII was evaluated as  $Y(II) = (F_M' - F)/F_M'$  according to Genty *et al.* (1989). Other PSII energy dissipation parameters were estimated according to Kramer *et al.* (2004) as : The yield of PSII non-photochemical energy dissipation via regulated pathways as  $Y(NPQ) = 1 - Y(II) - Y(NO)$ ; the yield of non-photochemical losses via non-regulated pathways of PSII as  $Y(NO) = 1/(NPQ + 1 + qL(F_M/F_0 - 1))$ , where  $NPQ = (F_M - F_M')/F_M'$ . The parameter  $qL = qP \times F_0'/F$ , where  $qP = (F_M' - F)/(F_M' - F_0')$ , was used as indicator to evaluate fraction of open PSII reaction centers participating in electron transport.  $F_0$  fluorescence yield was considered when PSII was at maximum oxydized state (dark adapted state) and the  $F_0'$  fluorescence yield was considered when PSII was under light adapted state as  $F_0' = F_0/(F_V/F_M + F_0/F_M')$  according to Oxborough



and Baker (1997). PSI maximal quantum yield was determined in dark adapted samples as  $\Phi_{MI} = (P_m - P) / (P_m - P_0)$ . The PSI energy dissipation was calculated according to Klughammer and Schreiber (1994) as: PSI quantum yield  $Y(I) = (P_m' - P) / (P_m - P_0)$ ; the non photochemical energy dissipation of PSI caused by oxidized P700 as  $Y(ND) = (P - P_0) / (P_m - P_0)$ . Non photochemical energy dissipation of PSI caused by P700 that cannot be oxidized by a saturation pulse was estimated as  $Y(NA) = (P_m - P_m') / (P_m - P_0)$ . In these parameters,  $P_m$  and  $P_m'$  are the maximum change of P700 signal in dark and light adapted state respectively,  $P$  the P700 transmittance signal caused by actinic light before the saturating flash and  $P_0$  the minimal level of P700 transmittance change measured after the saturating pulse, when P700 is reduced by electrons from PSII.

#### 4.5. HPLC analysis

Samples of 10 mL of algal culture was used for pigment extraction in 100% methanol at 65°C according to Lichtenthaler (1987). The HPLC analysis for Chl *a*, Chl *b*, violaxanthin and zeaxanthin was done according to Schagerl *et al.* (2003) where acetone was replaced by ethyl acetate. Separations were performed by using a Phenomenex Nucleosil C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm particle size, 100 Å pore size) and a Water Nova Pak C18 precolumn (4 µm particle size).

#### 4.6. Data analysis and statistic

The experiments were done in four independent measurements for all treatments. Means and standard deviation were estimated for each treatment. Significant differences between controls and dichromate treated samples were determined by using Student's *t* test where *p* value less than 0.05 was considered to be significant.

### 5. RESULTS AND DISCUSSION

Photosynthetic activity and growth of *C. reinhardtii* were evaluated after 24 hours exposure to different dichromate concentrations. At 12.5 µM dichromate, growth rate was decreased by 65% while the ratio zeaxanthin / Chl (*a* + *b*) was increased by three times (Table 1). The change of zeaxanthin / Chl (*a* + *b*) ratio resulted from the concomitant decrease (-50%) of the

Chl *a* and *b* content with the increase of the zeaxanthin content per cell (Table 1). Such change of pigment composition induced by dichromate effect may alter energy dissipation in photosynthetic processes. Under those conditions, the photoinhibition preventing mechanisms trigger the xanthophylls cycle activity which participates in energy dissipation processes. Therefore, in algae exposed to 6  $\mu\text{M}$  dichromate, zeaxanthin content was increased and violaxanthin was concomitantly decreased, while the presence of violaxanthin was not detectable at 12.5  $\mu\text{M}$  dichromate treatment (Table 1). The increase of the ratio between xanthophylls pigments (antheraxanthin and zeaxanthin) and chlorophyll *a* was also found earlier when higher plant *Jungermannia exsertifolia* was exposed to cadmium (Otero *et al.*, 2006). Our study showed for dichromate to decrease D1 protein content, and consequently causing a decrease of maximal PSII quantum yield ( $\Phi_{\text{MII}}$ ) (Figure 1). We noticed that PSI maximal quantum yield ( $\Phi_{\text{MI}}$ ) was also decreased, therefore showing for dichromate effect to alter the entire PSII-PSI electron transport. Zeaxanthin accumulation was found in spite of xanthophylls cycle activity, when PSII-PSI electron transport was decreased by dichromate effect. This can be interpreted to be the consequence of  $\beta$ -carotene direct conversion into zeaxanthin. Such interpretation is supported by earlier findings that this reaction is independent of xanthophylls cycle and degradation of D1 protein (Depka *et al.*, 1998).

Strong quenching effect induced by dichromate was found for rapid O-P fluorescence transients, indicating deterioration of PSII electron transport toward to  $Q_A$ ,  $Q_B$  and PQ pool. Reduction of electron transport of PSII was well indicated by deconvolution of fluorescence yield rise related to transients O-J, J-I and I-P. The fluorescence yields concerning those transients were evidently reduced by dichromate (Figure 2 C and D). By comparing fluorescence quenching effect induced by dichromate at those transients, it appeared that the biggest effect was at I-P transient, which may indicate that PQ pool was less reduced by electron transport from water splitting system (Schreiber and Vidaver, 1976 ; Joly and Carpentier, 2007). Fluorescence quenching beyond P transient ( $\sim 250$  msec) was strongly diminished by dichromate effect indicating that dichromate inhibition alters also PSI electron transport since fluorescence quenching intensity following P transient is directly dependant to PSI activity (Schansker *et al.*, 2005) (Figure 2A). Therefore, we may indicate here for dichromate effect to inhibit electron transport dependant to PSII and PSI, beside PSII. Such

effects may result in inactivation of some PSII reaction centers. Indeed, the increase of PSII absorption cross-section, according to Strasser *et al.* (2004) shown here by the change of ABS/RC ratio (from 3.4 to 5.5 for 12.5  $\mu\text{M}$  dichromate effect), demonstrated that some of PSII reaction centers were inactivated (Table 2). Resulting from this effect, PSII electron transport capacity was diminished by 30%, which is shown by the decrease of complementary area (SM) above fluorescence curve from O to P transient (Strasser *et al.*, 2004). Furthermore, the decrease in PSII electron transport capacity may increase untrapped excitation energy dissipation within PSII reaction center as seen by an increase of DIO/RC from 1.2 to 2.8. Some similar effects have been reported earlier for higher plant *Spirodela polyrhiza* exposed to dichromate (Appenroth *et al.*, 2001). Electron flow from PSII to PSI was therefore decreased. However, fluorescence quenching induced by PQ pool redox-state (qPQ) was reduced from 0.38 to 0.21 (Table 2). As fluorescence is quenched by oxidized PQ, we may conclude that limitation of electron flow through PSI will slow down reoxidation of the PQ pool therefore this will reduce capacity of PQ to quench PSII variable fluorescence.

Since we showed for dichromate effect to have heterogeneous inhibition sites concerning functional and structural properties of PSII and PSI, it appeared that it was important to find out how this effect is associated with PSII-PSI energy dissipation pathway. Energy dissipation dependent to PSII activity, according to Kramer *et al.* (2004), was determined as distribution of dissipation between PSII operational quantum yield,  $Y(\text{II})$ , PSII regulated non-photochemical quenching,  $Y(\text{NPQ})$ , and PSII non-regulated non-photochemical quenching,  $Y(\text{NO})$ . For PSI, according to Klughammer and Schreiber (1994), we determined energy dissipation as distribution of dissipation between PSI operational quantum yield,  $Y(\text{I})$ , PSI non-photochemical energy dissipation caused by oxidized P700,  $Y(\text{ND})$ , and PSI non photochemical energy dissipation caused by reduced P700 unable to give electron due to an electron acceptor limitation,  $Y(\text{NA})$  (Figure 3). The participation of energy dissipation via PSII primary photochemistry ( $Y(\text{II})$ ) was decreased from 37 to 12% when algae were exposed 24h to 12.5  $\mu\text{M}$  dichromate, while non-regulated non photochemical quenching effect,  $Y(\text{NO})$ , was increased from 46 to 66%. At the same time, regulated non photochemical quenching,  $Y(\text{NPQ})$ , was not evidently changed. Therefore we may suppose that the unchanged  $Y(\text{NPQ})$  was the result of a low level of proton gradient in intrathylakoid

space and of the slow rate of PQ reoxidation processes (see Figure 2A). At the same time, participation of PSI photochemical quantum yield  $Y(I)$  was decreased from 70 to 28%, comparing control samples to 12.5  $\mu$ M dichromate treated algae, respectively, while absorbed light energy dissipation via non-photochemical processes of reduced P700, unable to donate electrons,  $Y(NA)$ , was increased from 27 to 70% (figure 3). We interpreted that such dichromate effect on energy balance was induced by limitation of PSI acceptor side therefore resulting in more reduced state of P700. Furthermore, the energy dissipation of PSI will have feedback on PSII electron transport rate and consequently on its energy dissipation processes resulting from limitation of acceptor side of PSI.

We may conclude for dichromate effect to decrease photosynthetic electron transport rate of both PSII and PSI. PQ pool reoxidation rate is reduced by decreased PSI electron transport activity. This effect was associated with the change of PSII structural properties seen by decrease of D1 protein content and pigment composition of the light harvesting complexes. Decreased electron transport activity of PSII and PSI by dichromate effect was associated with strong increase of energy dissipation via non-regulated non-photochemical energy dissipation in PSII, while the energy dissipation via PSI show for dichromate to affect electron transport on PSI acceptor side, resulting in an accumulation of reduced P700. Therefore, these findings will trigger further investigations concerning dichromate effect on interaction between photosynthetic electron transport and related energy storage via photosynthetic biochemical processes.

## 6. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr. Laszlo Kovacs for his critical reading and suggestions during preparation of this manuscript. This research was supported by the Natural Science and Engineering Council of Canada (NSERC) through grants 262210 awarded to P. Juneau and GP0093404 awarded to R. Popovic.

## 7. REFERENCES

- Ait Ali, N., D. Dewez, O. Didur and R. Popovic. 2006. "Inhibition of photosystem II photochemistry by Cr is caused by the alteration of D1 protein and oxygen evolving complex". *Photosynth. Res.*, vol. 89, p. 81-87.
- Appenroth, K. J., J. Stöckel, A. Srivastava and R. J. Strasser. 2001. "Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll *a* fluorescence measurements". *Environ. Pollut.*, vol. 115, p. 49-64.
- Baroli, I., A. D. Do, T. Yamane and K. K. Niyogi. 2003. "Zeaxanthin accumulation in the absence of a functional xanthophyll cycle protects *Chlamydomonas reinhardtii* from photooxidative stress". *The Plant Cell*, vol. 15, p. 992-1008.
- Bertrand, M., and I. Poirier. 2005. "Photosynthetic organisms and excess of metals". *Photosynthetica*, vol. 43, p. 345-353.
- Chandra, P., S. Sinha and U.N. Rai. 1997. "Bioremediation of Chromium from Water and Soil by Vascular Aquatic Plants". In *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*, Editors, E.L. Kruger, T.A. Anderson and J.R. Coats, p. 274-82. ACS Symposium Series, vol. 664, Washington, DC: American Chemical Society.
- Dat, J., S. Vandenabeele, E. Vranová, M. Van Montagu, D. Inzé and F. Van Breusegem. 2000. "Dual action of the active oxygen species during plant stress responses". *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 57, p. 779-795.
- Demmig-Adams, B. 1990. "Carotenoids and photoprotection in plants : a role for the xanthophylls zeaxanthin". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1020, p. 1-24.
- Demmig-Adams, B., and W. W. Adams III. 2006. "Photoprotection in an ecological context : the remarkable complexity of thermal energy dissipation". *New Phytologist*, vol. 172, p. 11-21.
- Depka, B., P. Jahns and A. Trebst. 1998. "β-Carotene to zeaxanthin conversion in the rapid turnover of the D1 protein of photosystem II". *FEBS Letters*, vol. 424, p. 267-270.
- De Filippis, L. F., and C.K. Pallaghy. 1994. "Heavy metals: sources and biological effects". In *Advances in Limnology Series: Algae and Water Pollution*, Editors, L.C. Rai, J.P. Gaur and C.J. Soeder, p. 31-77. E. Scheizerbartsche Press, Stuttgart.
- Genty, B., J. M. Briantais and N. R. Baker. 1989. "The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 990, p. 87-92.

- Harris, E. H. 1989. "The *Chlamydomonas* Sourcebook: A comprehensive guide to biology and laboratory use". San Diego, CA, Academic Press, 780 p.
- Havaux, M. and K. K. Niyogi. 1999. "The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanisms". *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, vol. 96, p. 8762-8767.
- Hörsik, Z. T., L. Kovacs, R. Laposi, I. Meszaros, G. Lakatos and G. Garab. 2007. "Effect of chromium on photosystem 2 in the unicellular green alga, *Chlorella pyrenoidosa*". *Photosynthetica*, vol. 45, p. 65-69.
- Joly, D., and R. Carpentier. 2007. "The oxidation/reduction kinetics of the plastoquinone pool controls the appearance of the I-peak in the O-J-I-P chlorophyll fluorescence rise: Effects of various electron acceptors". *J. Photochem. Photobiol. B.*, vol. 88, p. 43-50.
- Kato, M. C., K. Hikosaka, N. Hirotsu, A. Makino and T. Hirose. 2003. "The excess light energy that is neither utilized in photosynthesis nor dissipated by photoprotective mechanisms determines the rate of photoinactivation in photosystem II". *Plant Cell Physiol.*, vol. 44, p. 318-325.
- Kitajima, M., and W. L. Butler. 1975. "Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothylmoquinone". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 376, p. 105-115.
- Klughammer, C., and U. Schreiber. 1994. "An improved method, using saturating light pulses, for the determination of Photosystem I quantum yield via P700+-absorbance changes at 830 nm". *Planta*, vol. 192, p. 261-268.
- Kramer, D. M., G. Johnson, O. Kiirats and G. E. Edwards. 2004. "New fluorescence parameters for the determination of  $Q_A$  redox state and excitation energy fluxes". *Photosynth. Res.*, vol. 79, p. 209-218.
- Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature*, vol. 227, p. 680-685.
- Lichtenthaler, H. K. 1987. "Chlorophylls and caretonoids: pigments of photosynthetic biomembranes". In *Methods in enzymology*, Vol 148, Editors, L. Packer and R. Douce, p 350-382. Academic Press, London.
- Müller, P., X.-P. Li and K. K. Niyogi. 2001. "Non-photochemical quenching. A response to excess light energy". *Plant Physiol.*, vol. 125, p. 1558-1566.
- Nielsen, H., C. Brownlee, S. M. Coelho and M. T. Brown. 2003. "Inter-population differences in inherited copper tolerance involve photosynthetic adaptation and exclusion mechanisms in *Fucus serratus*". *New Phytologist*, vol. 160, p. 157-165.

- Niyogi, K. K. 2000. "Safety valves for photosynthesis". *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 3, p. 455-460.
- Otero, S., E. Nunez-Olivera, J. Martinez-Abaigar, R. Tomas, M. Arroniz-Crespo and N. Beaucourt. 2006. "Effects of cadmium and enhanced UV radiation on the physiology and the concentration of UV-absorbing compounds of the aquatic liverwort *Jungermannia exsertifolia* subsp. *Cordifolia*". *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 5, p. 760-769.
- Oxborough, K., and N. R. Baker. 1997. "Resolving chlorophyll *a* fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components-calculation of  $qP$  and  $F_v'/F_m$  without measuring  $F_0$ ". *Photosynth. Res.*, vol. 54, p. 135-142.
- Pagliano, C., M. Raviolo, F. D. Vecchia, R. Gabbrielli, C. Gonnelli, N. Rascio, R. Barbato and N. La Rocca. 2006. "Evidence for PSII donor-side damage and photoinhibition induced by cadmium treatment on rice (*Oryza sativa* L.)". *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 84, p. 70-78.
- Pätsikkä, E., M. Kairavuo, F. Sersen, E. M. Aro and E. Tyystjärvi. 2002. "Excess copper predispose photosystem II to photoinhibition in vitro by out competing iron and causing decrease in leaf chlorophyll". *Plant Physiol.*, vol. 129, p. 1359-1367.
- Pawlisz, A. V., R. A. Kent, U. A. Schneider and C. Jefferson. 1997. "Canadian Water Quality Guidelines for Chromium". *Environ. Toxicol. Water Qual.*, vol. 12, p. 185-193.
- Pospíšil, P., and H. Dau. 2002. "Valinomycin sensitivity proves that light-induced thylakoid voltages result in millisecond phase of chlorophyll fluorescence transients". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1554, p. 94-100.
- Rutherford, A. W., and A. Kriger-Lisazkay. 2001. "Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II". *Trends Biochem. Sci.*, vol. 26, p. 648-653.
- Schagerl, M., C. Pichler and K. Donabaud. 2003. "Patterns of major photosynthetic pigments in freshwater algae. 2. Dinophyta, Euglenophyta, Chlorophyceae and Charales". *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, vol.39, p. 49-62.
- Schansker, G., S. Z. Tóth and R. J. Strasser. 2005. "Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl *a* fluorescence rise OJIP". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1706, p. 250-261.
- Schreiber, U. and W. Vidaver. 1976. "The I D fluorescence transient. An indicator of rapid energy distribution changes in photosynthesis". *Biochim. Biophys. Acta*, vol 440, p. 205-214.

- Schreiber, U., U. Schliwa and W. Bilger. 1986. "Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer". *Photosynth. Res.*, vol. 10, p. 51-62.
- Strasser, B. J., H. Dau, I. Heinze and H. Senger. 1999. "Comparison of light induced and cell cycle dependent changes in the photosynthetic apparatus: A fluorescence induction study on the green alga *Scenedesmus obliquus*". *Photosynth. Res.*, vol. 60, p. 217-227.
- Strasser, B. J., and R. J. Strasser. 1995. "Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP test". In *Photosynthesis: from light to biosphere*, vol. 5, Editors, P. Mathis, p. 977-980. Kluwer Academic Publishers.
- Strasser, R.J., A. Srivastava et M. Tsimilli-Michael. 2004. "Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient". In *Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and respiration*. Editors G. Papageorgiou, Govindjee. vol. 19, pp. 321-362. The Netherlands : Kluwer Academic Publishers.



Table 4.1: The change of growth rate and pigment content of *C. reinhardtii* when exposed 24 hours to dichromate.

<b>[Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup>] (μM)</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>12.5</b>
<b>Growth rate (d<sup>-1</sup>)</b>	0.84 ± 0.04	0.53 ± 0.06	0.29 ± 0.04
<b>Zeaxanthin / (Chl <i>a+b</i>)</b>	0.06 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.22 ± 0.03
<b>Chl <i>a+b</i> / cell (x 10<sup>-7</sup> μg)</b>	20.2 ± 3.1	13.3 ± 4.2	10.1 ± 2.5
<b>Zeaxanthin / cell (x 10<sup>-7</sup> μg)</b>	1.25 ± 0.1	1.70 ± 0.4	2.17 ± 0.2
<b>Violaxanthin / cell (x 10<sup>-7</sup> μg)</b>	0.54 ± 0.06	0.03 ± 0.04	n.d.

Table 4.2: The change of rapid chlorophyll a fluorescence induction parameters when *C. reinhardtii* was exposed 24h to dichromate. For more details, see material and methods.

$[\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}]$ ( $\mu\text{M}$ )	0	6	12.5
$A_{O-J}$	$349 \pm 62$	$260 \pm 8$	$188 \pm 25$
$A_{J-I}$	$138 \pm 20$	$94 \pm 9$	$72 \pm 12$
$A_{I-P}$	$111 \pm 9$	$66 \pm 4$	$35 \pm 5$
$ABS/RC$	$3.40 \pm 0.14$	$4.13 \pm 0.10$	$5.48 \pm 0.29$
$S_M$	$15.45 \pm 1.07$	$14.34 \pm 0.03$	$10.62 \pm 1.05$
$DI_O/RC$	$1.17 \pm 0.12$	$1.75 \pm 0.02$	$2.88 \pm 0.33$
$qPQ$	$0.20 \pm 0.01$	$0.17 \pm 0.01$	$0.13 \pm 0.01$

$[\text{Cr}_2\text{O}_6^{2-}]$ ( $\mu\text{M}$ )	0	6	12.5
D1 protein content			
$\Phi_{\text{MII}}$	0.67 $\pm 0.01$	0.65 $\pm 0.03$	0.54 $\pm 0.06$
$\Phi_{\text{MI}}$	0.86 $\pm 0.01$	0.74 $\pm 0.03$	0.68 $\pm 0.08$

Figure 4.1: Chromium effect on D1 protein content, quantum yield of PSII ( $\Phi_{\text{MII}}$ ) and PSI ( $\Phi_{\text{MI}}$ ) when *C. reinhardtii* was exposed 24 hours to dichromate.

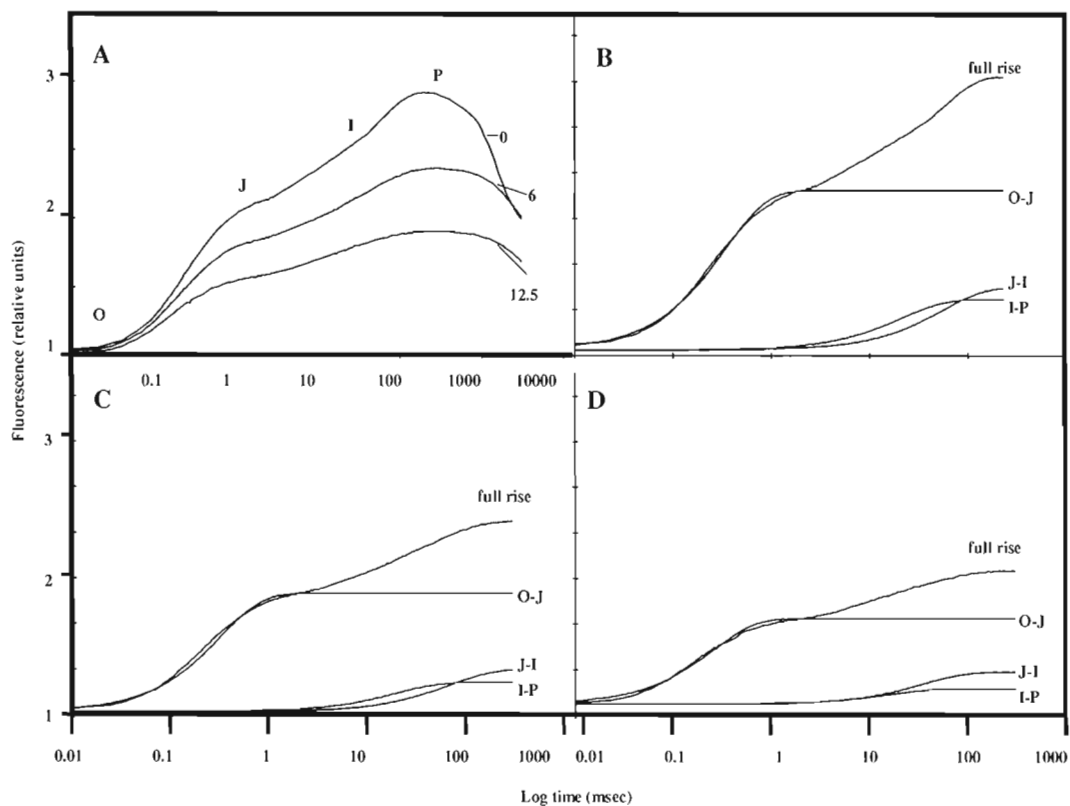


Figure 4.2: Change of rapid chlorophyll rise of dark adapted samples of *C. reinhardtii* exposed to dichromate for 24h. (A): Rapid rise of fluorescence with transitions O, J, I and P level of fluorescence; numbers represent dichromate concentration used for treatments. Deconvolution of O-P chlorophyll fluorescence rise according to Pospíšil and Dau (2002) for control (B), 6  $\mu\text{M}$  (C) and 12.5  $\mu\text{M}$  (D).

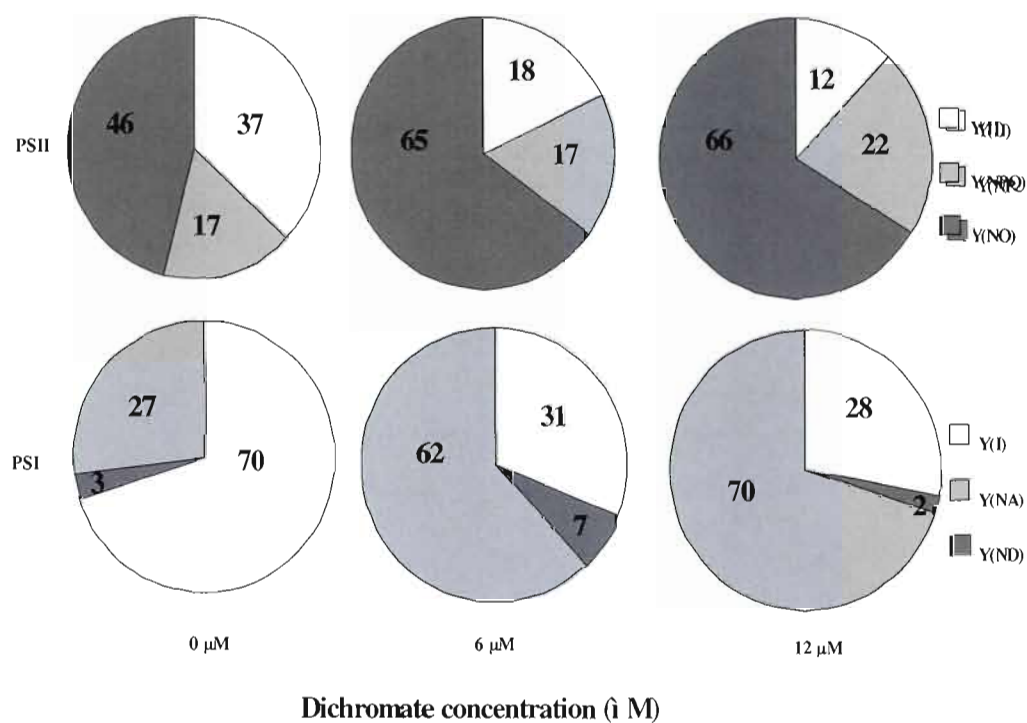


Figure 4.3: The change of steady state energy dissipation when *C. reinhardtii* was exposed 24h to dichromate. The values of parameters are presented as percentage value participating in PSII and PSI energy dissipation considered as 100%. For more details, see material and methods.

## CHAPITRE V

### CONCLUSION

Les objectifs de notre projet de recherche portaient sur les effets toxiques des nanoparticules d'oxyde de cuivre encapsulées et du dichromate sur la photosynthèse d'une algue verte, *C. reinhardtii*. Les paramètres photosynthétiques utilisés dans cette étude sont basés sur la fluorescence chlorophyllienne. Le but de cette étude a été d'utiliser l'avantage des paramètres photosynthétiques dans l'évaluation de toxicité de ces polluants. Notre travail a aussi contribué à mieux assimiler comment les métaux affectent l'ensemble du système photosynthétique d'une algue verte. Nos conclusions de recherche sont appuyées sur deux études :

- L'influence des nanoparticules d'oxyde de cuivre encapsulées sur la morphologie d'une culture cellulaire et la photosynthèse d'une algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii*.
- L'étude des effets inhibiteurs du dichromate sur le transport d'électrons photosynthétique donc sur les mécanismes de dissipation d'énergie du PSII et du PSI.

La première partie de ce projet consistait à étudier les effets des nanoparticules d'oxyde de cuivre encapsulée sur l'ensemble de la population d'une culture de *C. reinhardtii*, et d'analyser l'impact sur l'activité photosynthétique au niveau du photosystème II à court terme. L'ensemble de l'étude a été effectué sur une période de 6 h pour éviter la dilution des effets par l'augmentation de la densité cellulaire. Dans cette optique, nous avons évalué la croissance cellulaire, la quantité de pigments chlorophylliens, la formation d'ERO, la structure de la communauté et l'impact sur l'activité photosynthétique au niveau du PSII. La densité cellulaire et la quantité de pigments sont utilisées comme indicateur de biomasse. Nous avons utilisé un marqueur du peroxyde d'hydrogène et cytométrie en flux pour l'analyse des espèces réactives de l'oxygène comme indicateur du stress oxydatif. L'absorption atomique nous a permis de suivre le relargage du cuivre dans le milieu. La fluorimétrie par le « Plant Efficient Analyser » (PEA) a permis d'étudier les effets des nanoparticules d'oxyde de cuivre encapsulée sur l'activité photosynthétique du PSII. La nanoparticule étant composée de deux parties, nous avons effectué ces analyses avec la nanoparticule d'oxyde de cuivre encapsulée, la nanoparticule d'oxyde de cuivre seule et la

capsule seule, afin de mieux identifier la provenance des effets toxiques sur l'algue. Donc sur la base de ces études, nous avons conclu que la nanoparticule d'oxyde de cuivre encapsulée induisait une importante agrégation cellulaire après une courte exposition (6h). Ceci indique que *C. reinhardtii* est capable de changer rapidement ses propriétés structurales en réponse aux nanoparticules d'oxyde de cuivre encapsulée. Nous avons mis en évidence que la nanoparticule d'oxyde de cuivre encapsulée entraînait l'altération de l'intégrité cellulaire par la formation d'espèces réactive de l'oxygène. Nous avons été capables de constater que ces espèces réactives de l'oxygène sont responsables de la détérioration des pigments chlorophylliens et par conséquent, de la diminution significative de la photochimie primaire du PSII dans la photosynthèse de l'algue. Les dommages importants de l'appareil photosynthétique font que l'énergie lumineuse absorbée sera principalement dissipée par les voies non-photochimiques. Cette étude démontre que les nanoparticules d'oxyde de cuivre encapsulées sont capables d'induire d'importants effets toxiques au niveau photochimique dans la photosynthèse chez l'algue. Il est important de noter que ces effets n'ont pas été observés lorsque l'algue est exposée aux constituants de la nanoparticule de CS-CuO-NP séparée. Nous avons donc pu démontrer l'importance des propriétés morphologique nanoparticulaire qui jouent un rôle primordial dans l'induction des effets toxiques. Par conséquent, cette étude démontre que les nanoparticules d'oxyde de cuivre sont toxiques pour l'algue si elles sont enveloppées dans un polymère organique. Il est à noter que les effets toxiques pourraient être dus à l'activité photocatalytique de la nanoparticule d'oxyde de cuivre encapsulée qui entraînerait la formation de ERO directement, déjà démontré pour la nanoparticule d'oxyde de cuivre seul (Bandara *et al.*, 2005).

La seconde partie de nos recherches, nous avons étudié les effets toxiques du dichromate sur les processus de dissipation d'énergie des PSII et I chez *C. reinhardtii*. L'objectif était de déterminer l'influence du dichromate sur la dissipation d'énergie entre les PSII et PSI. Pour cette partie, notre méthodologie consistait à identifier le changement du contenu en protéine D1 par *Western blot*, l'identification et la quantification des pigments par chromatographie liquide à haute performance. Le transport des électrons et les processus de dissipation d'énergie du PSII et PSI ont été étudiés par fluorescence chlorophyllienne et changement d'absorbance. Nous avons conclu que le dichromate induit une altération structurale du PSII,

indiquée par une diminution du contenu en protéine D1 et par un changement dans la composition des pigments photosynthétiques. Ce changement impliquait une augmentation du ratio zeaxanthine / Chl *a + b* ce qui a indiqué une activation du cycle des xanthophylles et une augmentation de la dissipation d'énergie sous forme de chaleur. Nos résultats montrent que la diminution du transport d'électron du PSII et du PSI par le dichromate est associée à une forte augmentation de la dissipation d'énergie via les voies non-photochimiques non-régulées du PSII. Nous avons constaté que ce changement indique un dommage au niveau du PSII lorsque les algues sont exposées au dichromate. Cependant, la dissipation d'énergie par le PSI suggère un autre site possible d'inhibition du dichromate situé du côté accepteur du PSI. Les résultats de cette partie indiquent que le dichromate altère la dissipation d'énergie des deux photosystèmes. Donc, l'inhibition du transport d'électrons photosynthétique par le dichromate entraîne un dommage au niveau du PSII et une augmentation de la dissipation non-photochimique non-régulée.

Notre recherche nous permet de conclure que les paramètres photosynthétiques peuvent être utilisés pour l'évaluation de la toxicité des métaux. Les nanoparticules d'oxyde de cuivre encapsulées et le dichromate induisent une augmentation de la dissipation d'énergie par des mécanismes non-photochimiques, ce qui indique photoinhibition du PSII. L'inhibition du transport d'électrons du côté accepteur du PSI par le dichromate peut contribuer à augmenter la sensibilité à la photoinhibition chez les algues exposées aux métaux. De plus, la formation d'espèces réactive de l'oxygène chez les algues exposées aux nanoparticules d'oxyde de cuivre encapsulé entraîne aussi la photoinhibition du PSII. Les nombreuses mesures des différents paramètres, indicateurs de la photochimie dans la photosynthèse et l'énergie de dissipation, nous ont permis de démontrer la grande utilité de ces paramètres pour évaluer les risques de toxicité par les métaux étudiés. De plus, les indicateurs de formation d'espèces réactives de l'oxygène ont aussi été démontrés comme excellent indicateur de toxicité. Donc nos hypothèses ont été justifiées par les conclusions qui se sont avérées utiles pour le domaine fondamental et applicable dans la toxicologie environnementale.



## RÉFÉRENCES

- Adams, L. K., D. Y. Lyon et P.J.J. Alvarez. 2006. "Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, and ZnO water suspensions". *Water Res.*, vol. 40, p. 3527-3532.
- Adonaylo, V. N. et P.I. Oteiza. 1999. «Lead intoxication: Antioxidative defense and oxidative damage in rat brain ». *Toxicol.*, vol. 135, p. 77-85.
- Ait Ali, N., D. Dewez, O. Didur et R. Popovic. 2006. "Inhibition of photosystem II photochemistry by Cr is caused by the alteration of D1 protein and oxygen evolving complex". *Photosynth. Res.*, vol. 89, p. 81-87.
- Almeida, E., T. Diamantino et O. de Sousa. 2007. "Marine paints: the particular case of antifouling paints". *Prog. Org. Coatings*, vol. 59, p. 2-20.
- Arsenault, G., A.D. Cvetkovic et R. Popovic. 1993. "Toxic effects of copper on *Selenastrum capricornutum* measured by a flow cytometry-based method". *Water Poll. Res. J. Canada*, vol. 28, p. 757-765.
- Appenroth, K. J., J. Stöckel, A. Srivastava and R. J. Strasser. 2001. "Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements". *Environ. Pollut.*, vol. 115, p. 49-64.
- Appenroth, K. J., A. Keresztes, E. Sarvari, A. Jaglarz et W. Fischer. 2003. "Multiple effects of chromate on *Spirodela polyrhiza*: electron microscopy and biochemical investigations". *Plant Biol.*, vol. 5, p. 315-323.
- Aravind, P., et M. N. V. Prasad. 2004. "Zn protects chloroplasts and associated photochemical functions in cadmium exposed *Ceratophyllum demersum* L., a freshwater macrophyte". *Plant Sciences*, vol. 166, p. 1321-1327.
- Aruoja, V., H.-C. Dubourgier, K. Kasemets et A. Kahru. 2009. "Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*". *Science Of The Total Environment*, vol. 407, p. 1461-1468.
- Asada, K. 1994. "Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues". In *causes of photooxydative stress and amelioration of defence systems in plants*. Editors C. H. Foyer et P. M. Mullineaux, p. 77-104. Boca Raton : CRC Press.
- Atal, N., P. P. Saradhi et P. Mohanty. 1991. "Inhibition of the chloroplast photochemical reactions by treatment of wheat seedlings with low concentrations of cadmium : Analysis of electron transport activities and changes in fluorescence yield". *Plant Cell Physiology*, vol. 32, p. 943-951.

- Baker, N. R., J. Harbinson et D. M. Kramer. 2007. "Determining the limitations and regulation of photosynthetic energy transduction in leaves". *Plant, Cell and Environment*, vol. 30, p. 1107-1125.
- Bandara, J., I. Guasaquillo, P. Bowen, L. Soare, W.F. Jardim et J. Kiwi. 2005. "Photocatalytic storing of  $O_2$  as  $H_2O_2$  mediated by high surface area CuO. Evidence for reductive-oxidative interfacial mechanism". *Langmuir*, vol. 21, p. 8554-8559.
- Banerjee, S., J. Gopal, P. Muraleedharan, A.K. Tyagi et B. Raj. 2006. "Physics and chemistry of photocatalytic titanium dioxide: Visualization of bactericidal activity using atomic force microscopy". *Curr. Sci.*, vol. 90, p. 1378-1383.
- Barber, J., et W. Kuhlbrandt. 1999. "Photosystem II". *Curr. Opi. Struct. Biol.*, vol. 9, p. 469-475.
- Baroli, I., A. D. Do, T. Yamane et K. K. Niyogi. 2003. "Zeaxanthin accumulation in the absence of a functional xanthophyll cycle protects *Chlamydomonas reinhardtii* from photooxidative stress". *The Plant Cell*, vol. 15, p. 992-1008.
- Bassi, R., D. Sandona et R. Croce. 1997. "Novel aspect of chlorophyll *a/b* binding proteins". *Physiol. Plant.*, vol. 100, p. 769-779.
- Bellafiore, S., F. Barneche, G. Peltier et J.-D. Rochaix. 2005. "State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7". *Nature*, vol. 433, p. 892-895.
- Ben-Shem, A., F. Frolov et N. Nelson. 2003. "Crystal structure of plant photosystem I". *Nature*, vol. 426, p. 630-635.
- Bertrand, M., et I. Poirier. 2005. "Photosynthetic organisms and excess of metals". *Photosynthetica*, vol. 43, p. 345-343.
- Blankenship, R. E. 2002. "Molecular mechanisms of Photosynthesis". Oxford : Blackwell Science Ltd., pp. 328.
- Boisvert, S., D. Joly, S. Leclerc, S. Govindachary, J. Harnois et R. Carpentier. 2007. "Inhibition of the oxygen-evolving complex of photosystem II and depletion of extrinsic polypeptides by nickel". *Biometals*, vol. 20, p. 879-889.
- Boucher, N., et R. Carpentier. 1999. "Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, and Pb<sup>2+</sup>-induced changes in Photosystem II photochemical yield and energy storage in isolated thylakoid membranes: A study using simultaneous fluorescence and photoacoustic measurements". *Photosynth. Res.*, vol. 59, p. 167-174.

- Bowler, C., W. Van Camp, M. Van Montagu et D Inzé. 1994. « Superoxide dismutase in plants ». *Crit. Rev. Plant Sci.*, vol. 13, p. 199–218.
- Boyer, P. D. 1993. “The binding change mechanism for ATP synthase – some probabilities and possibilities”. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1140, p. 215-250.
- Buchanan, B. B., W. Gruissem et R. L. Jones. 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Maryland : Rockville, 1367 p.
- Butler, W. L., et M. Kitajima. 1975. “A tripartite model for chloroplast fluorescence”. *Proceedings, 3rd International Congress on Photosynthesis*, p. 13-24.
- Campbell, N. A. 1995. « La Photosynthèse ». *Biologie*, p. 199-220, Montréal : ERPI.
- Caspi, V., M. Droppa, G. Horváth, S. Malkin, J. B. Marder et V. I. Raskin. 1999. “The effect of copper on chlorophyll organization during greening of barley leaves”. *Photosynth. Res.*, vol. 62, p. 165-174.
- Chitnis, P. R. 2001. “Photosystem I : Function and Physiology”. *Annual Review of Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 52, p. 593-626.
- Clijsters, H., et F. Van Assche. 1985. “Inhibition of photosynthesis by heavy metals”. *Photosynth. Res.*, vol. 7, p. 31-40.
- Crane, M., R.D. Handy, J. Garrod et R. Owen. 2008. “Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles”. *Ecotox.*, vol. 17, p. 421-437.
- Daigle, J.-C. et J.P. Claverie. 2008. “A simple method for forming hybrid core shell nanoparticles suspended in water”. *J. Nanomaterials*, vol. 2008, p. 1-8.
- Dau, H. 1994. “Molecular mechanisms and quantitative models of variable photosystem II fluorescence”. *Photochem. Photobiol.*, vol. 60, p. 1-23.
- De Las Rivas, J. D., M. Balsera et J. Barber. 2004. “Evolution of oxygenic photosynthesis : genome-wide analysis of the OEC extrinsic proteins”. *Trends Plant Sci.*, vol. 9, p. 18-25.
- Dekker, J. P., et E. J. Boekema. 2005. “Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants”. *Biochim. Biophys Acta*, vol. 1706, p. 12-39.
- Dekker, J. P., et R. Van Grondelle. 2000. “Primary charge separation in photosystem II”. *Photosynth. Res.*, vol. 63, p. 195-208.

- Demmig B, K. Winter, A. Krüger et F-C. Czygan. 1987. "Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. A possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy". *Plant Physiol.*, vol. 84, p. 218–224.
- Demmig-Adams, B., et W. W. III Adams. 1996. "The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis". *Trends Plant Sci.*, vol. 1, p. 21-26.
- Dewez, D., L. Geoffroy, G. Vernet et R. Popovic. 2005. "Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*". *Aquat. Toxicol.*, vol. 74, p. 150-159.
- Duysens, L. N. M., et H. E. Sweers. 1963. "Mechanism of the two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence". In *Studies on microalgae and photosynthetic bacteria*. Editors, L. N. M. Duysens et H. E. Sweers, p. 353-372. Japanese Society of Plant Physiologists. Tokyo: University of Tokyo Press.
- Faller P., K. Kienzler, A. Krieger-Liszkay. 2005. "Mechanism of  $\text{Cd}^{2+}$  toxicity:  $\text{Cd}^{2+}$  inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential  $\text{Ca}^{2+}$  site". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1706, p. 158-164.
- Force, L., C. Critchley et J.J.S. van Rensen. 2003. "New fluorescence parameters for monitoring photosynthesis in plants: I. The effect of illumination on the fluorescence parameters of the JIP-test". *Photosynth. Res.*, vol. 78, p. 17-33.
- Foyer, C.H., H. Lopez-Delgado, J.F. Dat, et I.M. Scott. 1997. « Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling ». *Physiol. Plant.*, vol. 100, p. 241–254.
- Fujita, Y. 1997. "A study on the dynamic features of photosystem stoichiometry: Accomplishments and problems for future studies". *Photosynth. Res.*, vol. 53, p. 83-93.
- Genty, B., J.-M. Briantais et N. R. Baker. 1989. "The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 990, p. 87-92.
- Gerber, I.B. et I. A. Dubery. 2003. "Fluorescence microplate assay for the detection of oxidative burst products in tobacco cell suspensions using 2',7'-dichlorofluorescein". *Meth. Cell Sci.*, vol. 25, p. 115-122.
- Gobets, B., I. H. M. Van Stokkum, M. Rögner, J. Kruip, E. Schlodder, N. V. Karapetyan, J. P. Dekker et R. Van Grondelle. 2001. "Time-resolved fluorescence emission measurements of photosystem I particles of various cyanobacteria, a unified compartmental model". *Biophys. J.*, vol. 81, p. 407-424.
- Golbeck, J. H. 1987. "Structure, function and organization of the photosystem I reaction center complex". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 895, p. 167-204.

- Govindjee, et R. Govindjee. 1974. "The absorption of light in photosynthesis". *Sci. Am.*, vol. 231, p. 64-82.
- Govindjee, et W. T. Coleman. 1990. "How plants make oxygen". *Sci. Am.*, vol. 262, p.50-58.
- Green, B. R., et D. G. Durnford. 1996. "The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 47, p. 685-714.
- Greger, M. et M. Johansson. 2004. "Aggregation effects due to aluminium adsorption to cell walls of the unicellular green alga *Scenedesmus obtusiusculus*". *Phycol. Res.*, vol. 52, p. 53-58.
- Griffit, R. J., R. Weil, K. A. Hyndman, N. D. Denslow, K. Powers, D. Taylor et D. S. Barber. 2007. "Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*)". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 41, p. 8178-8186.
- Halliwell, B. et J.M.C. Gutteridge. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3e éd., New York, Oxford University Press, 936 pp.
- Handy, R. D., R. Owen et E. Valsami-Jones. 2008. "The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs". *Ecotox.*, vol. 17, p. 315-325.
- Harbinson J. et E. Rosenqvist. 2003. "An Introduction to Chlorophyll Fluorescence". In : *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*. J.R. DeEll et P.M.A. Toivonen (eds.), p. 1-30. London, Kluwer Academic Publishers.
- Haumann, M., et W. Junge. 1999. "Evidence for impaired hydrogen-bonding of tyrosine YZ in calcium-depleted photosystem II". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1411, p. 121-133.
- Hauska, G., M. Schütz et M. Büttner. 1996. "The cytochrome  $b_6f$  complex - composition, structure and function". In *Advances in Photosynthesis, Oxygenic Photosynthesis*. Editors, D. R. Ort, C. F. Yokum, p. 377-398. Dordrecht, The Netherlands : Kluwer Academic Publishers.
- Havaux, M., R. J. Strasser et H. Greppin. 1991. "A theoretical and experimental analysis of the  $Q_p$  and  $Q_N$  coefficients of chlorophyll fluorescence quenching and their relation to photochemical and nonphotochemical events". *Photosynth. Res.*, vol. 27, p. 41-55.
- Heller, R., R. Esnault et C. Lance. 1998. *Physiologie végétale. 1. Nutrition*. Paris : Dunod, pp. 323.
- Heredia, P. et J. De Las Rivas. 2003. "Calcium dependant conformational change and thermal stability of the isolated PsbO protein detected by FTIR spectroscopy". *Biochem.*, vol. 42, p. 11831-11838.

- Heung, W., M. J. Yun, D. P. Chang, P. G. Green et C. Halm. 2007. "Emissions of chromium (VI) from arc welding". *Journal of Air Waste Management Association*, vol. 57, p. 252-260.
- Hill R et F. L. Bendall. 1960. "Function of two cytochrome components in chloroplasts: a working hypothesis". *Nature*, vol. 186, p. 136-137.
- Hiyama, T. 1985. "Quantum yield and requirement for the photooxidation of P700". *Physiologie végétale*, vol. 23, p. 605-610.
- Hong, Y., H.-Y. Hu, X. Xie, A. Sakoda, M. Sagehashi et F.-M. Li. 2009. "Gramine-induced growth inhibition, oxidative damage and antioxidant responses in freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*". *Aquat. Toxicol.*, vol. 91, p. 262-269.
- Hörsik, Z. T., L. Kovacs, R. Laposi, I. Meszaros, G. Lakatos et G. Garab. 2007. "Effect of chromium on photosystem 2 in the unicellular green alga, *Chlorella pyrenoidosa*". *Photosynth.*, vol. 45, p. 65-69.
- Horton, P., A. V. Ruban et R. G. Walters. 1996. "Regulation of light harvesting in green plants". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 47, p. 655-684.
- Howell, D. et B. Behrends. 2006. "A methodology for evaluating biocide release rate, surface roughness and leach layer formation in a TBT-free, self-polishing antifouling formulation". *Biofouling*, vol. 22, p. 303-315.
- Ichihashi, Y. et Y. Matsumura. 2001. "Partial photooxidation of ethylene with water as oxidant over copper oxide supported on silica". *J. Catalysis*, vol. 202, p. 427-429.
- Jensen, P. E., R. Bassi, E. J. Boekema, J. P. Dekker, F. Jansson, D. Leister, C. Robinson and H. V. Scheller. 2007. "Structure, function and regulation of plant photosystem I". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1767, p. 335-352.
- Johnson, J., L. Schewel et T. E. Graedel. 2006. "The contemporary anthropogenic chromium cycle". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 40, p. 7060-7069.
- Joliot, P., et B. Kok. 1975. "Oxygen evolution in photosynthesis". In *Bioenergetics of Photosynthesis*. Govindjee, editor. Academic Press, New York. p.388-413.
- Jordan, P., P. Fromme, H. T. Witt, O. Kuklas, W. Saenger et N. Krauss. 2001. "Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å". *Nature*, vol. 411, p. 909-917.
- Juneau, P. A. El Berdey et R. Popovic. 2002. "PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornatum* and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 42, p. 155-164.

- Juneau, P., D. Dewez, Matsui S., S. G. Kim et R. Popovic. 2001. "Evaluation of different algal species sensitivity to mercury and metachlor by PAM-fluorometry". *Chemosphere*, vol. 45, 589-598.
- Juneau, P., et R. Popovic. 1999. "Evidence for the rapid phytotoxicity and stress evaluation using the PAM fluorometric method : importance and future application". *Ecotox.*, vol. 8, p. 449-455.
- Jupin, H., et A. Lamant. 1999. *La photosynthèse*. Paris, Dunod, 268 p.
- Kanervo, E., M. Suorsa et E. M. Aro. 2005. "Functional flexibility and acclimation of the thylakoid membrane". *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 4, p. 1072-1080.
- Karapetyan, N. V., E. Schlodder, R. Van Grondelle et J. P. Dekker. 2006. "The long-wavelength chlorophylls of photosystem I". In *Photosystem I : The light-driven, Plastocyanin:Ferredoxin Oxidoreductase*, Editors, J. H. Golbeck, p. 177-192. The Netherlands, Springer.
- Karlsson, H.L., P. Cronholm, J. Gustafsson et L. Möller. 2008. "Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes". *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 21, p. 1726-1732.
- Kautsky, H., et A. Hirsch. 1931. "Neue Versuche zur kohlenensäureassimilation". *Naturwissenschaften*, vol. 19, p. 964.
- Khrouchtchova, A., M. Hansson, V. Paakkarinen, J. P. Vainonen, S. P. Zhang, P. E. Jensen, H. V. Scheller, A. V. Vener, E. M. Aro et . Haldrup. 2005. "A previously found thylakoid membrane protein of 14 kDa (TMP14) is a novel subunit of plant photosystem I and is designated PSI-P". *FEBS Letters*, vol. 579, p. 4808-4812.
- Klughammer, C., et U. Schreiber. 1994. "An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700+ -absorbance changes at 830 nm". *Planta*, vol. 191, p. 261-268.
- Klughammer, C., et U. Schreiber. 2008. "Saturation Pulse method for assessment of energy conversion in PS I". *PAM Application Notes*, vol. 1, p. 11-14.
- Knauert, S., et K. Knauer. 2008. "The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae". *J. Phycol.*, vol. 44, p. 311-319.
- Knoetzel, J., A. Mant, A. Haldrup, P. E. Jensen et H. V. Scheller. 2002. "A new 10-kDa subunit of eukaryotic photosystem I". *FEBS Letters*, vol. 510, p. 145-148.

- Kobayashi, J. S., T. Kakizono, N. Nishio, S. Nagai, Y. Kurimara et Y. Tsuji. 1997. "Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 48, p. 351-356.
- Kok, B., B. Forbush et M. McGloin. 1970. "Cooperation of charges in photosynthetic O<sub>2</sub> evolution. I. A linear four-step mechanism". *Photochem. Photobiol.*, vol. 11, p. 457-475.
- Kono, Y. et I. Fridovich. 1982. « Superoxide radical inhibits catalase ». *J. Biol. Chem.*, vol. 257, p. 5751-5754.
- Kovacs, L., W. Wiessner, M. Kis, F. Nagy, D. Mende et S. Demeter. 2000. "Short- and long-term redox regulation of photosynthetic light energy distribution and photosystem stoichiometry by acetate metabolism in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*". *Photosynth. Res.*, vol. 65, p. 231-247.
- Kramer, D. M., G. Johnson, O. Kiirats et G. E. Edwards. 2004. "New fluorescence parameters for the determination of Q<sub>A</sub> redox state and excitation energy fluxes". *Photosynth. Res.*, vol. 79, p. 209-218.
- Krause, G.H., et E. Weis. 1991. "Chlorophyll fluorescence and photosynthesis : the basis". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 42, p.313-349.
- Kumar, P., R. K. Tewari et P. N. Sharma. 2008. "Cadmium enhances generation of hydrogen peroxide and amplifies activities of catalase, peroxidases and superoxide dismutase in maize". *J. Agron. Crop Sci.*, vol. 194, p. 72-80.
- Küpper, H., F. Kupper et M. Spiller. 1998. "In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants". *Photosynth. Res.*, vol. 58, p. 123-133.
- Krupa, Z., Oquist, G., and Huner, N. 1993. "The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris*- a fluorescence analysis". *Physiol. Plant.*, vol. 88, p. 626-630.
- Lavorel, J., J. Breton et M. Lutz. 1986. "Methodological principles of measurement of light emitted by photosynthetic systems". In *Light emission by plants and bacteria*, Govindjee, Ames, J., Fork, D.C. (eds.), Academic Press, San Diego, CA., pp. 57-98.
- Lavorel, J. et A.-L. Etienne. 1977. "In vivo chlorophyll fluorescence". In *Primary processes of photosynthesis*, J. Barber (eds.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, Netherlands, pp. 203-268.
- Lazár, D. 1999. "Chlorophyll a fluorescence induction". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1412, p. 1-28.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson et M. M. Cox. 1994. *Principes de biochimie*. 2ème édition. Paris : Médecine-Sciences Flammarion, 1120 p.



- Levy, J.L., B.M. Angel, J.L. Stauber, W.L. Poon, S.L. Simpson, S.H. Cheng et D.F. Jolley. 2008. "Uptake and internalisation of copper by three marine microalgae: Comparison of copper-sensitive and copper-tolerant species". *Aquat. Toxicol.*, vol. 89, p. 82-93.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. "Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes". *Meth. Enzymol.*, vol. 148, p. 350-383.
- Lledias, F., P. Rangel et W. Hansberg. 1998. « Oxidation of catalase by singlet oxygen ». *J. Biol. Chem.*, vol. 273, p. 10630-10637.
- Luo, J. 2007. "Toxicity and bioaccumulation in aquatic species". *Water Environmental Federation*, p.1-16.
- Malkin, R., et K. Niyogi. 2000. "Photosynthesis". In *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville : Maryland, pp. 568-628.
- Mathis, P., I. Ikegami et P. Setif. 1988. "Nanosecond flash studies of the absorption spectrum of the Photosystem I primary acceptor Ao". *Photosynth. Res.*, vol. 16, p. 203-210.
- McKersie, B. D., et Y. Y. Leshem. 1994. "Oxidative stress". In *Stress and stress coping in cultivated plants*. Editors, B. D. McKersie et Y. Y. Leshem, p. 15-54. Dordrecht, Pays-Bas : Kluwer Academic Publishers.
- Melis, A., A. Murakami, J. A. Nemson, K. Aizawa, K. Ohki et Y. Fujita. 1996. "Chromatic regulation in *Chlamydomonas reinhardtii* alters photosystem stoichiometry and improves the quantum efficiency of photosynthesis". *Photosynth. Res.*, vol. 47, p. 253-265.
- Mendoza-Cóztal, D.G., et R. Moreno-Sánchez. 2005. " $\text{Cd}^{2+}$  transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1706, p. 88-97.
- Mitchell, P. 1974. "A chemiosmotic molecular mechanism for proton-translocating adenosine triphosphatases". *FEBS Letters*, vol. 43, p. 189-194.
- Miyao, M., et Murata, N. 1984. "Role of the 33-kDa polypeptide in preserving Mn in the photosynthetic oxygen-evolving system and its replacement by chloride ions". *FEBS Letters*, vol. 170, p. 350-354.
- Mohamed, Z.A. 2008. "Polysaccharides as a protective response against microcystin-induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significance in the aquatic ecosystem". *Ecotox.*, vol. 17, p. 504-516.
- Monnet, F., N. Vaillant, P. Vernay, A. Coudret, H. Sallanon et A. Hitmi. 2001. "Relationship between PSII activity,  $\text{CO}_2$  fixation, and Zn, Mn and Mg contents of *Lolium perenne* under zinc stress". *J. Plant Physiol.*, vol. 158, p. 1137-1144.

- Moore, M.N. 2006. "Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment ?". *Environ. Int.*, vol. 32, p. 967-976.
- Moronsito, T., S. Caffari, L. Dall'Osto et R. Bassi. 2003. "Mechanistic aspect of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids". *Physiol. Plant.*, vol. 119, p. 347-354.
- Müller, P., X.-P. Li et K. K. Niyogi. 2001. "Non-photochemical quenching. A response to excess light energy". *Plant Physiol.*, vol. 125, p. 1558-1566.
- Mustárdy, L., et G. Garab. 2003. "Granum revisited. A three-dimensional model where things fall into place". *Trends Plant Sci.*, vol. 8, p. 117-122.
- Murakami, A., Y. Fujita, Nemson J. A. et A. Melis. 1997. "Chromatic regulation in *Chlamydomonas reinhardtii*: Time course of photosystem stoichiometry adjustment following a shift in growth light quality". *Plant Cell Physiol.*, vol. 38, p. 188-193.
- Mysliwa-Kurdziel, B., et K. Strzalka. 2005. "Influence of Cd(II), Cr(VI) and Fe(III) on early steps of deetiolation process in wheat: fluorescence spectral changes of protochlorophyllide and newly formed chlorophyllide". *Agriculture, Ecosystems and Environment*, vol. 106, p. 199-207.
- Nagel, K., U. Adelmeier, J. Voigt. 1996. "Subcellular distribution of cadmium in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*". *J. Plant Physiol.*, vol. 149, p. 86-90.
- Navarro, E., A. Baun, R. Behra, N. B. Hartmann, J. Filser, A.-J. Miao, A. Quigg, P. H. Santschi et L. Sigg. 2008a. "Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi". *Ecotox.*, vol. 17, p. 372-386.
- Navarro, E., F. Piccapietra, B. Wagner, F. Marconi, R. Kaegi, N. Odzak, L. Sigg et R. Behra. 2008b. "Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*". *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, p. 8959-8964.
- Neubauer, C., et U. Schreiber. 1987. "The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination : I. Saturation characteristics and partial control by the photosystem II acceptor side". *Zeitschrift für Naturforschung*, vol. 42, p. 1246-1254.
- Nishiyama, Y., S.I. Allakhverdiev et N. Murata. 2006. "New paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1757, p. 742-749.
- Niyogi, K. K., O. Björkman et A. R. Grossman. 1997a. "The role of specific xanthophylls in photoprotection". *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 94, p. 14162-14167.

- Niyogi, K. K. 1999. "Photoprotection revisited : Genetic and molecular approaches". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, vol. 50, p. 333-359.
- Niyogi, K. K. 2000. "Safety valves for photosynthesis". *Curr. Opin. Plant Biol.*, vol. 3, p. 455-460.
- Niyogi, K. K., X.-P. Li, V. Rosenburg et H.-S. Jung. 2004. "Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis?". *J. Exp. Bot.*, vol. 56, p. 375-382.
- Oberdörster, E. 2004. "Manufactured nanoparticles (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass". *Environmental Health Perspectives*, vol. 112, num. 10, p. 1058-1062.
- Okamoto, O. K. Et P. Colepiccolo. 1998. « Response of superoxide dismutase to pollutant metal stress in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* ». *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 119, p. 67-73.
- Otero, S., E. Nunez-Olivera, J. Martinez-Abaigar, R. Tomas, M. Arroniz-Crespo et N. Beaucourt. 2006. "Effects of cadmium and enhanced UV radiation on the physiology and the concentration of UV-absorbing compounds of the aquatic liverwort *Jungmannia exsertifolia* subsp. *Cordifolia*". *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 5, p. 760-769.
- Pagliano, C., M. Raviolo, F. D. Vecchia, R. Gabbrielli, C. Gonnelli, N. Rascio, R. Barbato et N. La Rocca. 2006. "Evidence for PSII donor-side damage and photoinhibition induced by cadmium treatment on rice (*Oryza sativa* L.)". *J. Photochem. Photobiol.*, vol. 84, p. 70-78.
- Palozza, P., et N. I. Krinsky. 1992. "Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model". *Archives Biochem. Biophys.*, vol. 297, p. 291-295.
- Papageorgiou, G. 1975. "Chlorophyll fluorescence: an intrinsic probe of photosynthesis". In *Bioenergetics of photosynthesis*. Editor, Govindjee. New York : Academic Press, pp. 319-372.
- Pätsikkä, E., E.-M. Aro et E. Tyystjärvi. 1998. "Increase in the quantum yield of photoinhibition contributes to copper toxicity in vivo". *Plant Physiol.*, vol. 117, p. 619-627.
- Pätsikkä, E., E.-M. Aro et E. Tyystjärvi. 2001. "Mechanism of copper-enhanced photoinhibition in thylakoid membranes". *Physiol. Plant.*, vol. 113, p. 142-150.
- Pawlisz, A. V, R. A. Kent, U. A. Schneider et C. Jefferson. 1997. "Canadian water quality guidelines for Cr". *Environ. Toxicol. Water Qual.*, vol. 12, p. 185-193.

- Peterson, M. M., G. L. Horst, P. J. Shea et S. D. Comfort. 1998. "Germination and seedling development of switchgrass and smooth brome grass exposed to 2,4,6-trinitrotoluene". *Environ. Pollut.*, vol. 99, p. 53-59.
- Pinto, E., T.C.S. Sigaud-Kutner., M.A.S. Leitão, O.K. Okamoto, D. Morse et P. Colepicolo. 2003. "Heavy metal-induce oxydative stress in algae". *J. Phycol.*, vol. 39, p. 1008-1018.
- Popelkova, H., S. D. Betts, N. Lydakis-Symantiris, M. M. Im, E. Swenson et C. F. Yocum. 2006. "Mutagenesis of basic residues R151 and R161 in manganese-stabilizing protein of photosystem II causes inefficient binding of chloride to the oxygen evolving complex". *Biochem.*, vol. 45, p. 3107-3115.
- Popovic, R., D. Dewez et P. Juneau. 2003. "Applications of chlorophyll fluorescence in ecotoxicology: Heavy metals, herbicides, and air pollutants". In *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*, Toivonen, P., DeEll, J. (eds.), Kluwer Academic Publisher, pp. 152-179.
- Poulson, M., G. Samson et J. Whitmarsh. 1995. "Evidence that cytochrome b559 protects photosystem II against photoinhibition". *Biochem.*, vol. 34, p. 10932-10938.
- Prasad, M. N. V., et K. J. Dietz. 1999. "Heavy metals stress in plants". In *Free radical and reactive oxygen species as mediator of heavy metal*. Editor, B. Heidelberg, Elsevier, pp. 73-97.
- Quinlan, G. J., B. Halliwell, C.P. Moorhouse et J.M.C. Gutteridge. 1988. « Action of lead (II) and aluminium (III) ions on ironstimulated lipid peroxidation in liposomes, erythrocytes and rat liver microsomal fractions ». *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 962, p. 196-200.
- Randhawa, V. K., F. Zhou, X. Jin, C. Nalewajko et D. J. Kushner. 2001. "Role of oxydative stress and thiol antioxydant enzymes in nickel toxicity and resistance in strains of the green alga *Scenedesmus acutus f. alternans*". *Can. J. Microbiol.*, vol. 47, p. 987-993.
- Rai, L. C., Y. Husaini et N. Mallick. 1996. "Physiological and biochemical responses of *Nostoc linckia* to combined effects of aluminium, fluoride and acidification". *Environ. Exp. Bot.*, vol. 36, p. 1-12.
- Rai, L. C., Y. Husaini et N. Mallick. 1998. "pH-altered interaction of aluminium and fluoride on nutrient uptake, photosynthesis and other variables of *Chlorella vulgaris*". *Aquat. Toxicol.*, vol. 42, p. 67-84.
- Rai, V., P. Vajpayee, S. N. Singh et S. Mehrota. 2004. "Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, prolin level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L.". *Plant Sci.*, vol. 167, p. 1159-1169.

- Raines, C. 2003. "The Calvin cycle revisited". *Photosynth. Res.*, vol. 75, p. 1-10.
- Raven, J. A., M. C. W. Evans et R. E. Korb. 1999. "The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O<sub>2</sub>-evolving organisms". *Photosynth. Res.*, vol. 60, p. 111-149.
- Rawn, J.D. 1990. "La photosynthèse". Dans *Traité de biochimie*, p. 489-532, Bruxelles, Belgique : De Boeck-Wesmael.
- Robinson, N. J., P.E. Urwin, P.J. Robinson, et P.J. Jackson. 1994. « Gene expression in relation to metal toxicity and tolerance ». In *Stress Induced Gene Expression in Plants*, ed. A.J. Basra, p. 209-248. Amsterdam: Harwood Academic Publishers.
- Rodriguez M. C., L. Barsanti, V. Passarelli, V. Evangelista, V. Conforti et P. Gualtieri. 2007. "Effects of chromium on photosynthetic and photoreceptive apparatus of the alga *Chlamydomonas reinhardtii*". *Environ. Res.*, vol. 105, p. 234-239.
- Rohacek, K. et M. Bartak. 1999. "Technique of the modulated chlorophyll fluorescence : basic concepts, useful parameters, and some applications". *Photosynth.*, vol. 37, p. 339-363.
- Rohacek, K. 2002. « Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships ». *Photosynth.*, vol. 40, p. 13-29.
- Rutherford, A. W., et P. Heathcote. 1985. "Primary photochemistry in photosystem I". *Photosynth. Res.*, vol. 6, p. 293-316.
- Samson, G., et R. Popovic. 1988. "Use of algal fluorescence for determination of phytotoxicity of heavy metals and pesticides as environmental pollutants". *Ecotox. Environ. Safe.*, vol. 16, p. 272-278.
- Samson, G., et R. Popovic. 1990. "Inhibitory effects of mercury on photosystem II photochemistry in *Dunaliella tertiolecta* under in vivo conditions". *J. Photochem. Photobiol. B.*, vol. 5, p. 303-310.
- Sandberg, J., I. Odenvall Wallinder, C. Leygraf et M. Virta. 2007. "Release and chemical speciation of copper from anti-fouling paints with different active copper compounds in artificial seawater". *Mater. Corros.*, vol. 58, p. 165-172.
- Sas, K. N., L. Kovacs, O. Zsiros, Z. Gombos, G. Garab, L. Hemmingsen et E. Danielsen. 2006. "Fast cadmium inhibition of photosynthesis in cyanobacteria in vivo and in vitro studies using perturbed angular correlation of  $\gamma$ -rays". *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 11, p. 725-734.
- Schmid, V. H. R., P. Potthast, M. Wiener, V. Bergauer, H. Paulsen et S. Storf. 2002. "Pigment binding of photosystem I light-harvesting proteins". *J. Biol. Chem.*, vol. 277, p. 37307-37314.

- Schreiber, U., U. Schliwa et W. Bilger. 1986. "Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer". *Photosynth. Res.*, vol. 10, p. 51-62.
- Schützendübel, A., P. Schwanz, T. Teichmann,, K. Gross, R. Langenfeld-Heyser, D.L. Godbold et A. Polle. 2001. « Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots ». *Plant Physiol.*, vol. 127, p. 887-898.
- Seidler, A. 1996. "The extrinsic polypeptides of photosystem II". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1277, p. 35-60.
- Shanker, A. K., C. Cervantes, H. Loza-Tavera et S. Avudainayagam. 2005. "Chromium toxicity in plants". *Environ. Intern.*, vol. 31, p. 739-753.
- Shimoni, E., O. Rav Hon, I. Ohad, V. Brumfeld et Z. Reich. 2005. "Three dimensional organisation of higher-plant chloroplast thylakoid membranes revealed by electron tomography". *The Plant Cell*, vol. 17, p. 2580-2586.
- Sigfridsson, K. G. V., G. Bernat, F. Mamedov et S. Styring. 2004. "Molecular interference of  $\text{Cd}^{2+}$  with Photosystem II". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1659, p. 19-31.
- Singh, N. et A. Turner. 2009. "Leaching of copper and zinc from spent antifouling paint particles". *Environ. Pollut.*, vol. 157, p. 371-376.
- Stohs, S.J., D. Bagchi, E. Hassoun et M. Bagchi. 2000. « Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions ». *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, vol. 19, p. 201-213.
- Strasser, B.J., H. Dau, I. Heinze et H. Senger. 1999. « Comparison of light induced and cell cycle dependant changes in photosynthetic apparatus: a fluorescence induction study on the green alga *Scenedesmus obliquus* ". *Photosynth. Res.*, vol. 60, p. 217-227.
- Strasser, B.J. et R.J. Strasser. 1995. "Measuring fast fluorescence transients to adress environmental questions: the JIP-test". In *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, Mathis, P. (ed.), 5. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 977-980.
- Strasser, R. J. 1997. "Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients". *Photosynth. Res.*, vol. 52, p. 147-155.
- Strasser, R. J., et Govindjee. 1991. "The  $\text{F}_0$  and O-J-I-P fluorescence rise in higher plants and algae". Dans *Regulation of chloroplast biogenesis*. Editor, J. H. Argyroudi-Akoyunoglou, p. 423-426. New York : Plenum Press.

- Strasser, R. J., A. Srivastava et Govindjee. 1995. "Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria". *Photochem. Photobiol.*, vol. 61, p. 32-42.
- Strasser, R. J., A. Srivastava et M. Tsimilli-Michael. 2000. "The fluorescence transient as tool to characterize and screen photosynthetic samples". Dans *Probing photosynthesis : mechanisms, regulation and adaptation*. Editors, M. Yunus, U. Pathre et P. Mohanty, p. 445-483. Taylor and Francis, London.
- Strasser, R.J., A. Srivastava et M. Tsimilli-Michael. 2004. "Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient". Dans *Chlorophyll Fluorescence a Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and respiration*. Editors G. Papageorgiou, Govindjee. vol. 19, pp. 321-362. The Netherlands : Kluwer Academic Publishers.
- Strasser, R. J., et A. D. Stirbet. 2001. "Estimation of the energetic connectivity of PSII centers in plants using the fluorescence rise O-J-I-P fitting of experimental data to three different PSII models". *Math. Comput. Simulat.*, vol. 56, p. 451-461.
- Subrahmanyam, D., et V. S. Rathore. 2000. "Influence of manganese toxicity on photosynthesis in ricebean (*Vigna umbellata*) seedlings". *Photosynthetica*, vol. 38, p. 449-453.
- Sueoka, N., K.S. Chiang et J.R. Kates. 1967. „Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores". *J. Mol. Biol.*, vol. 25, p. 44-67.
- Takahashi, S., et N. Murata. 2008. "How do environmental stresses accelerate photoinhibition?" *Trends Plant Sci.*, vol. 13, p. 178-182.
- Thorner, J. P., D. T. Morishige, S. Anadan et G. F. Peter. 1991. "Chlorophyll-carotenoid proteins of higher plant thylakoids". Dans *Chlorophylls*. Editor, H. Scheer, p. 549-585. Londres : CRC Press.
- Tripathy, B. C., B. Bhatia et P. Mohanty. 1981. "Inactivation of chloroplast photosynthetic electron-transport activity by  $\text{Ni}^{2+}$ ". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 638, p. 217-224.
- Tripathy, B. C., B. Bhatia et P. Mohanty. 1983. "Cobalt ions inhibits electron-transport activity of photosystem II without affecting Photosystem I". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 722, p. 88-93.
- Van Camp, W., H. Willekens, C. Bowler, M. Van Montagu, D. Inzé, P. Reupold-Popp, H. Sanderman et C. Langebartels. 1994. « Elevated Levels of Superoxide Dismutase Protect Transgenic Plants Against Ozone Damage ». *Bio/Technology*, vol. 12, p. 165-168.
- Van Kooten, O., et J. F. H. Snel. 1990. "The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology". *Photosynth. Res.*, vol. 25, p. 147-150.

- Vredenberg, W.J. 2000. "A three-state model for energy trapping and chlorophyll fluorescence in photosystem II incorporating radical pair recombination". *Biophys. J.*, vol. 79, p. 26-38.
- Walker, C. H., S. P. Hopkin, R. M. Sibly et D. B. Peakall. 1996. *Principles of ecotoxicology*. Taylor and Francis Inc., Bristol, USA, 321 pp.
- Wang, S. et X. Shi. 2001. « Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis ». *Mol. Cell Biochem.*, vol. 222, p. 3-9.
- Wang, J., X. Zhang, Y. Chen, M. Sommerfeld et Q. Hu. 2008. "Toxicity assessment of manufactured nanomaterials using the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*". *Chemosphere*, vol. 73, p. 1121-1128.
- Whitmarsh, J. 1998. "Electron transport and energy transduction". Dans *Photosynthesis: A Comprehensive Treatise*. Editors, A. S. Raghavendra, p. 87-107. Cambridge University Press, Cambridge.
- Whitmarsh, J., et Govindjee. 1999. "The photosynthetic process". Dans *Concept in Photobiology Photosynthesis and Photomorphogenesis*. Editors, G. S. Singhal, G. Renger, S. K. Sopory, K.D. Irragang and Govindjee, p. 11-51. New Delhi, India, Dordrecht, The Netherlands : Kluwer Academic Publishers.
- Williams, L. E., J. K. Pittman et J. L. Hall. 2000. "Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants". *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1465, p. 104-126.
- Wincencjusz, H., C. F. Yocum et H. J. Van Gorkom. 1999. "Activating anions that replace Cl<sup>-</sup> in the O<sub>2</sub>-evolving complex of photosystem II slow the kinetics of the terminal step in water oxidation and destabilize the S2 and S3 states". *Biochem.*, vol. 38, p. 3719-3725.
- Wollman F. A. 2001. "State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus". *The EMBO Journal*, vol. 20, p. 3623-3630.
- Yi, X., M. McChargue, S. Laborde, L. K. Frankel et T. M. Bricker. 2005. "The manganese-stabilizing protein is required for photosystem II assembly/stability and photoautotrophy in higher plants". *J. Biol. Chem.*, vol. 280, p. 16170-16174.
- Zhao, Y., H. Meng, Z. Chen, F. Zhao et Z. Chai. 2007. "Biological activities of nanomaterials/nanoparticles". In *Nanotoxicology: Interactions of nanomaterials with biological systems*, Zhao, Y., Nalwa, H. S., (eds). American Scientific Publishers, CA, USA, pp. 1-28.



- Zhou, W., P. Juneau et B. Qiu. 2006. "Growth and photosynthetic responses of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to elevated levels of cadmium". *Chemosphere*, vol. 65, p. 1738-1746.
- Zrýd, J. P., M. Lanoz, F. Rachidi et P. Zwiacki. 2002. "Influence of HF electromagnetic fields on the development and the molecular biology of the moss *Physcomitrella patens* and the nematode *Caenorhabditis elegans*". *14th International Symposium on Electromagnetic Compatibility*, Proceedings Supplement, p. 179-180.